

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIDAD DE POSGRADO

**Eventos moleculares que afectan la evolución del Virus
de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1) en
sujetos peruanos infectados, en Lima y Callao**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

AUTOR

Carlos Augusto YABAR VARAS

ASESOR

Rina Lastenia RAMÍREZ MESÍAS

Lima – Perú

2017

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Papá Dios por darme la posibilidad de estudiar un Doctorado y más aún poder terminar la tesis. Por derramar Sus dones sobre mí y multiplicarlos.

Agradezco a mi mamita Nelly porque nunca dejó de apoyarme y hacerme recordar la imperiosa necesidad de sacar el grado. Gracias mamita.

Agradezco a mi esposa Camucha por su paciencia y comprensión durante aquellos momentos que la dejé en completo abandono por sumergirme en el análisis y redacción de esta tesis. Gracias amor, prometo compensar ese tiempo hasta hacernos pasitas.

Agradezco a mis hermanos Tavo, Lucho y Clarita por ser estar siempre a mi lado y motivarme en el camino de la superación.

Agradezco a todos mis compañeros de trabajo del Laboratorio de VTS/VIH-SIDA del INS, especialmente a Soledad Romero por los permisos y facilidades para hacer los trámites, a Giovanny Vilcarino, Mariela Yaya y Susan Espetia por cubrirme durante los permisos otorgados. Gracias amigos queridos.

Agradezco finalmente a mi asesora la Dra Rina Ramírez, quien aceptó gentilmente guiarme en el desarrollo de esta tesis y que corrigió, con exquisita minuciosidad, cada párrafo de este trabajo.

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis a mis hijos Carlita Sofía Belén y Carlitos Joaquín: razón de mi vida, luz de camino, paz de mi corazón y fruto de amor con mi esposa Camucha. Los amo con toda mi alma.

También dedico esta tesis a la memoria de mi papito Carlos, quien desde el Cielo me guía y me conforta, me alienta y me levanta cuando mis fuerzas corporales se vuelven insignificantes frente a aquellas que nunca se desvanecen, las fuerzas espirituales.

Siempre ten presente que la piel se arruga, el pelo se vuelve blanco, los días se convierten en años...pero lo importante no cambia; tu fuerza y tu convicción no tienen edad.

Tu espíritu es el plumero de cualquier tela de araña. Detrás de cada línea de llegada, hay una de partida. Detrás de cada logro, hay otro desafío. Mientras estés viva, siéntete viva.

Si extrañas lo que hacías, vuelve hacerlo. No vivas de fotos amarillas. Sigue aunque todos esperen que abandones. No dejes que se oxide el hierro que hay en ti.

Haz, que en vez de lástima, te tengan respeto. Cuando por los años, no puedas correr, trota. Cuando no puedas trotar, camina. Cuando no puedas caminar, usa el bastón. Pero nunca te detengas.

Madre Teresa de Calcuta

CONTENIDO

	Pag.
Resumen.....	<i>i</i>
Abstract.....	<i>ii</i>
Lista de Tablas.....	<i>iii</i>
Lista de Figuras.....	<i>v</i>
Lista de abreviaturas.....	<i>vii</i>
1.Introducción.....	1
2.Antecedentes.....	4
3. Hipótesis y objetivos.....	13
4. Materiales y métodos.....	14
5. Resultados.....	45
6. Discusión.....	82
7. Conclusiones.....	101
8. Recomendaciones.....	102
9. Referencias bibliográficas.....	104
10. Anexos.....	118

Resumen

Objetivo. Describir los eventos relacionados con la evolución molecular del VIH-1 en sujetos peruanos TS y NTS infectados de Lima y Callao.

Materiales y métodos. Se realizó el análisis molecular del VIH a partir de 93 sujetos infectados, 61 fueron trabajadoras y trabajadores sexuales (TS) y 32 militares no trabajadores sexuales (NTS). Se extrajo el ADN proviral de toda la población, el cual fue sometido a PCR para la amplificación de los genes *gag*, *env*, y *pol* de VIH-1. Los productos fueron purificados, secuenciados y analizados. Los productos de PCR de *env* fueron analizados mediante ensayo de movilidad de heterodúplex (HMA) y luego clonados y secuenciados en vectores plasmídicos para la identificación de variantes genéticas virales por medio de análisis filogenético. Las secuencias fueron analizadas usando herramientas de bioinformática para la identificación de subtipos genéticos, recombinación, mutaciones en regiones conservadas, mutaciones de resistencia a los antirretrovirales (ARV), hipermutación y tropismo. Para el análisis estadístico de frecuencias, riesgo absoluto (RO) e índice de asociación se usó el programa SPSS versión 21.

Resultados. Se demostró que todas las muestras analizadas fueron subtipo B con evidencia de recombinación entre diferentes subtipos, siendo la forma B/D la más frecuente (28%). Se hallaron dieciocho casos de infecciones mixtas y 66% de virus con tropismo R5. Los virus restantes con tropismo X4 fueron más frecuentes en pacientes con CD4 < 200 células/mL. Asimismo, se hallaron mutaciones no conservadas en la región de MHR, principalmente en TS, incluyendo un caso de hipermutación. También se halló un índice de 24% de resistencia frente a los ARV. Dentro de ello, se encontró evidencia de resistencia primaria (17%) la cual estuvo asociada con el ejercicio del trabajo sexual ($p = 0.04$) y con la presencia de infecciones mixtas ($p = 0.01$).

Conclusiones. Este trabajo demuestra que la evolución molecular del VIH sigue trayectorias diferentes entre TS y NTS, siendo la presencia de algunos factores de riesgo como infecciones mixtas y el ejercicio del trabajo sexual determinantes en este proceso.

Palabras clave: VIH, evolución molecular, trabajador sexual, recombinación genética, resistencia a los antirretrovirales

Abstract

Aim. To describe the molecular events related to evolution of HIV infecting Peruvian people from Lima and Callao.

Materials and Methods. Molecular analyses were performed in 93 HIV-infected subjects, from which 61 were male and female sex workers (SW) and 32 were non-sex workers from army (NSW). Pro-viral DNA was extracted which was used for *gag*, *env* and *pol* genes amplification. The PCR products were purified, sequenced and analyzed. The *env* PCR product was analyzed by the Heteroduplex Mobility Assay (HMA). Then cloned and sequenced by using plasmid vectors in order to identify the viral strains through phylogenetic approaches. Sequences obtained were analyzed to identify genetic subtypes, recombination, mutations occurring in conserved domains, antiretroviral resistant mutations, hypermutation and tropism. SPSS version 21 was used for the calculation of frequency, odd ratio and association index.

Results. Subtype B was identified showing recombination evidence specially B / D recombination, which was the most frequent (28%). Eighteen cases of mixed infection were identified, showing a sample infected by two different phylogenetic lineages. On the other hand, 66% viral samples showed R5-tropism, while X4 lineages were more frequent from patient showing CD4 less than 200 cells per mL. Non-conserved mutations were identified from MHR domain mainly from SW including one case of hypermutation. In addition, a high percent of antiretroviral resistance was found (24%). In this case, 17% showed primary resistance which was associated either to sexual work ($P = 0.04$) as mixed infections ($P = 0.01$).

Conclusions. This work showed that the HIV molecular evolution follows different routes for both SW and NSW. Risk factors such as mixed infections and sexual work are relevant in this process.

Keywords: HIV, molecular evolution, sex worker, genetic recombination, antiretroviral resistance

Tabla 1. Características y factores de riesgo de los participantes del estudio.....	16
Tabla 2. Lista de <i>primers</i> usados durante la realización de la presente tesis.....	24
Tabla 3. Porcentaje de sensibilidad del PCR de acuerdo a los marcadores <i>gag</i> , <i>env</i> , <i>prt</i> y <i>tr</i> analizados a partir de la población estudiada (n = 93).....	46
Tabla 4. Análisis de la diversidad genética entre los genes <i>gag</i> , <i>pol</i> y <i>env</i> de VIH mediante el Test D de Tajima.....	47
Tabla 5. Análisis de la diversidad genética entre los grupos TS y NTS mediante el Test de D de Tajima.....	48
Tabla 6. Validación de métodos de análisis filogenético para la identificación de subtipos de VIH de referencia.....	51
Tabla 7. Análisis de simulación de recombinación intra e intergenética en los genes <i>gag</i> , <i>env</i> y <i>pol</i> utilizando secuencias de referencia de VIH-1.....	58
Tabla 8. Eventos de recombinación en VIH-1 de acuerdo al tipo de gen analizado.....	59
Tabla 9. Eventos de recombinación en VIH-1 de acuerdo al tipo de población de riesgo analizada.....	59
Tabla 10. Caracterización del Tropismo de VIH a través del análisis de la región V3 del gen <i>env</i> en TS y NTS.....	64

Tabla 11. Análisis de CV y recuento de CD4 de acuerdo al tropismo de las muestras de VIH a partir de la población estudiada.....	69
Tabla 12. Comparación de cambios de aminoácidos debido a mutaciones en el dominio MHR del gen gag de VIH-1 entre las poblaciones analizadas.....	70
Tabla 13. Cambios genéticos debido a la hipermutación de la región <i>pol</i> (proteasa y transcriptasa reversa) de la muestra código BF9 de VIH-1	71
Tabla 14. Hipermutación de la muestra BF9 de VIH-1 mostrando los tipos de cambios genéticos ocurridos.....	72
Tabla 15. Lista de mutaciones asociadas a la resistencia molecular a los antirretrovirales en VIH-1 de la población estudiada.....	73
Tabla 16. Frecuencia de la resistencia a los antirretrovirales en VIH-1 de tipo adquirida (tratados) y transmitida (naive) en la población estudiada.....	74
Tabla 17. Distribución de acuerdo al sexo de la resistencia a los antirretrovirales del VIH-1 en la población analizada.....	75
Tabla 18. Índice de riesgo absoluto (OR) entre los eventos de evolución molecular de VIH-1 y los factores epidemiológicos identificados en la población de estudio.....	78
Tabla 19. Índice de riesgo absoluto (OR) entre eventos de evolución molecular de VIH en la población analizada.....	79
Tabla 20. Índice de asociación (χ^2) entre los eventos de evolución molecular de VIH-1 y los factores de riesgo de la población analizada.....	80
Tabla 21. Índice de asociación entre los eventos de evolución molecular de VIH en la población analizada.....	81

Lista de Figuras	Pag.
Figura 1. Ubicación de los primers que amplifican las porciones genéticas de A) 460 pb del gen gag (p24-p7), 550 pb del gen env (C2-V5), B) 400 pb del gen prt, 337 del gen rt, y C) 1500 pb-1700 pb de la región pol (prot-tr).....	27
Figura 2. Amplificación de productos de PCR correspondiente al gen gag (A), gen env (B), gen prt (C), tr (D) y pol (E) del VIH-1 en muestras de sujetos infectados.....	45
Figura 3A. Análisis filogenético de muestras de VIH-1 a través del método de Máxima Verosimilitud con un bootstrap de 500 réplicas mediante análisis del gen <i>gag</i> a partir de muestras de VIH de pacientes estudiados.....	52
Figura 3B. Análisis filogenético de muestras de VIH-1 a través del método de Máxima Verosimilitud con un bootstrap de 500 réplicas mediante análisis del gen <i>env</i> a partir de muestras de VIH de pacientes estudiados.....	53
Figura 3C. Análisis filogenético de muestras de VIH-1 a través del método de Máxima Verosimilitud con un bootstrap de 500 réplicas mediante análisis del gen <i>pol</i> a partir de muestras de VIH de pacientes estudiados.....	54
Figura 3D. Análisis filogenético de muestras de VIH-1 a través del método de Máxima Verosimilitud con un bootstrap de 500 réplicas mediante análisis de concatenación de los genes <i>gag-pol-env</i> a partir de muestras de VIH de pacientes estudiados.....	55
Figura 4. Simulación de infección inter-subtipo (A) e intra-subtipo (B) mediante HMA utilizando el gen env de VIH-1 a partir de los subtipos de referencia de VIH (Ver sección Materiales y Métodos).....	61

Figura 5. Análisis de HMA mediante el gen <i>env</i> de VIH-1 para la identificación de casos de infecciones mixtas a partir de un grupo de TS (carriles 1 al 8) y NTS (carriles del 9 al 14).....	62
Figura 6A. Análisis de miniprep a partir de la muestra BM61 de VIH-1 mostrando los plásmidos que portan el gen de interés <i>env</i> de VIH.....	62
Figura 6B. Análisis de PCR a partir de plásmidos recombinantes mostrando el producto de amplificación del gen <i>env</i> para la confirmación de la clonación molecular.....	62
Figura 7. Análisis de PCR a partir de plásmidos recombinantes mostrando el producto de amplificación del gen <i>env</i> para la confirmación de la clonación molecular.....	63
Figura 8. Modelo de transmisión de VIH en la población seleccionada donde se intenta representar los eventos de evolución del VIH basado en los resultados obtenidos en el presente estudio.....	100

Lista de Abreviaturas

°C	Grados centígrados
ADN	Acido desoxirribonucleico
ARV	Antirretroviral
APS	Persulfato de Amonio
ARN	Ácido ribonucleico
CCR5	Receptor de quimiocina tipo 5
CD4	Molécula de grupo de diferenciación 4
CD8	Molécula de grupo de diferenciación 8
CXCR4	Receptor de la quimiocina con motivo C-X-C de tipo 4
dNTP	Deoxinucleótidostrifosfatos
dATP	Deoxiadenosintrifosfato
dCTP	Deoxicitosintrifosfato
dGTP	Deoxiguanidintrifosfato
dTTP	Deoxitimidintrifosfato
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético
<i>env</i>	Gen de la envoltura
<i>gag</i>	Gen antígeno específico
HSH	Hombres que tienen sexo con otros hombres
INTR	Inhibidores nucleósidos de la transcriptasa reversa
INNTR	Inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa reversa
IP	Inhibidores de la proteasa
IPTG	Isopropil - β - D- tiogalactopiranósido
Kb	Kilobase

LB	Luria-Bertani
N	Normalidad
ml	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
O.D.	Densidad óptica
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>pol</i>	Gen de la Polimerasa
<i>prt</i>	Gen de la proteasa
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Lauril Sulfato de Sodio
SIDA	Síndrome de la inmunodeficiencia humana
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TAE	Tris-Acido acético EDTA
TARGA	Terapia antirretroviral de gran actividad
TEMED	N, N, N,' N,'- tetrametilendiamino
<i>tr</i>	Gen de la transcriptasa reversa
TRIS	Tris [hidroximetil]- aminometano
U	Unidad de actividad de una enzima
μg	Microgramo
μL	Microlitro
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3 indolil β-D-galactopiranósido
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana

1. INTRODUCCIÓN

El Síndrome de la Inmunodeficiencia Humana (SIDA) denominado así por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) (CDC, 1982) se manifestó por primera vez en cinco jóvenes homosexuales a través de una infección oportunista poco común asociada a una deficiencia de la respuesta inmunológica causada por *Pneumocystis carinii*. Dos años después, se logró caracterizar el virus responsable de la enfermedad por el Instituto Nacional de Cáncer y el Instituto Pasteur, el cual fue bautizado con el nombre de Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) (Marx, 1984).

En la actualidad, el VIH/SIDA es considerado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y por el Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA (ONUSIDA) como una pandemia, que viene generando cerca de 1.1 millones de muertes alrededor del mundo. Los casos nuevos hasta finales de 2015 llegaron a más de dos millones de personas entre niños y adultos (WHO, 2016a, UNAIDS, 2016a). En nuestro país, la epidemia por VIH ha sido clasificada como epidemia concentrada (McCarthy *et al.*, 1996; Cabello, 2005) con más de 35 mil casos confirmados de VIH, de los cuales 97% fueron transmitidos por vía sexual (OGE, 2016).

El VIH-1 está dividido en tres grupos genéticos: el grupo M (del inglés main o principal), O (del inglés outlier), N (de new o nuevo) (Kuiken *et al.*, 2000) y el recientemente descubierto grupo P a partir de una mujer proveniente de Camerún (Plantier *et al.*, 2009). De todos ellos M es el más común y se subdivide en once subtipos clasificados desde la A hasta la K (Kostrikis *et al.*, 1995; Kuiken *et al.*, 2000).

Aunque la primera cepa de VIH logró aislarse en 1984 (Marx, 1984), recientes estudios determinaron que su origen habría sido en 1920 en la localidad de Kinshasa perteneciente a la República Democrática del Congo. Esto habría sido posible luego que una cepa viral proveniente de un simio chimpancé infectara a un ser humano (Faria *et al.*, 2014). La forma cómo el

VIH logró atravesar la barrera humana y establecerse exitosamente en ella aún no ha sido demostrada, sin embargo la teoría más consistente propone que es a través de la práctica de la cacería, ya que se cuenta con evidencia que algunos virus que infectan simios lograron invadir el organismo humano a través de esta actividad (Wolfe *et al.*, 2004). Una vez establecido en el ser humano, el virus comenzó un proceso de evolución que le permitió dar lugar a las variantes genéticas que hoy se conocen (Kuiken *et al.*, 2000).

Es importante indicar que en los últimos veinte años se han llevado a cabo numerosos estudios que han permitido caracterizar los diferentes eventos moleculares que favorecen la evolución del VIH. Dentro de estos eventos podemos mencionar los siguientes:

- *Diversidad genética producto de la tasa de error de la transcriptasa reversa*, enzima viral que carece de actividad de corrección de lectura (Bebenek *et al.*, 1989). La misma actividad de esta enzima ha permitido la generación de los subtipos genéticos conocidos hoy en día (Rambaut *et al.*, 2004). Asimismo, por su característica de sintetizar de manera parcial las hebras complementarias de ADN durante la fase de transcripción reversa, es responsable de generar recombinación cuando hay infección mixta de variantes genéticas (Onafuwa-Nuga & Telesnitsky, 2009; Jia *et al.*, 2016).
- *Infecciones mixtas de variantes genéticas de VIH*, evento de infección viral relacionado mayormente con la actividad sexual de riesgo del hombre mismo, el cual se caracteriza por la superinfección o co-infección de variantes genéticas de VIH de origen filogenético distinto en un mismo individuo (Smith *et al.*, 2005). Generalmente conduce a eventos de recombinación (Fang *et al.*, 2004).
- *Recombinación*, proceso por el cual el material genético de dos o más cepas virales se mezclan generando un nuevo genoma con capacidad replicativa diferente a las anteriores generaciones (Zhang *et al.*, 2010).

- *Hipermutación*, proceso de alta tasa de mutación en el genoma viral generada por la actividad del complejo humano APOBEC3 (Lecossier *et al.*, 2003).
- *Tropismo de VIH*, característica de la cepa viral por la cual presenta afinidad por los co-ligandos celulares CCR5 o CXCR4, o por ambos al mismo tiempo debido a la presencia de mutaciones a nivel de la región V3 del gen *env* (Berger *et al.*, 1999).
- *Mutaciones de resistencia a antirretrovirales*, conjunto de mutaciones seleccionadas por el tratamiento antirretroviral, las cuales confieren al virus resistencia a uno o más fármacos. También confieren al virus polimorfismo o diversidad genética (Clutter *et al.*, 2016).

En la presente tesis se estudian cada uno de los eventos moleculares citados anteriormente que afectan la evolución del VIH, a través de un diseño de corte transversal en sujetos peruanos infectados. A continuación se describirán los principales antecedentes.

2. ANTECEDENTES

2.1. Diversidad genética del VIH-1

Es importante señalar que el VIH-1 se encuentra en un proceso dinámico de evolución, no sólo debido a la alta tasa de error de su transcriptasa reversa, sino también favorecido por las infecciones mixtas o superinfecciones de variantes genéticas de VIH, las cuales contribuyen con la formación de cepas recombinantes y consecuentemente con la aparición de variantes genéticas con una alta capacidad infectiva y de resistencia a diferentes antirretrovirales (ARV) (Rambaut *et al.*, 2004). Todos estos eventos no fueron descubiertos al mismo tiempo, sino que fueron saliendo a la luz paulatinamente a través del tiempo, conforme fueron descubriéndose nuevos aspectos relacionados con la interacción VIH-hombre (Yabar, 2003).

En este contexto, las herramientas moleculares han sido de fundamental ayuda para establecer la clasificación genética del virus con base a la información brindada por su material genético. Dentro de los principales subtipos (comentados anteriormente) el subtipo C representa al 60% de todos los casos en el mundo (Requejo, 2006), no obstante existe una distribución geográfica diferencial de los subtipos por continentes.

Así tenemos que el subtipo B es el más prevalente en América y Europa, mientras que el C se encuentra más frecuentemente en África y Asia (Thomson & Najera, 2005; Requejo, 2006). Sin embargo en los últimos años, nuevos subtipos no endémicos vienen siendo reportados en diferentes países (Kaleebu *et al.*, 1995; Garcia-Lerma *et al.*, 1996; Naganawa *et al.*, 2002; Siddappa *et al.*, 2005). Recientemente se ha reportado en nuestro país los subtipos C y H a partir de una población de adultos y niños con TARGA (Yabar *et al.*, 2012). La importancia de la presencia de nuevos subtipos radica en las diferencias de patogenicidad y perfil de resistencia a los ARV que existe entre ellos (Rambaut *et al.*, 2004, Requejo, 2006).

Recientes datos muestran evidencias que en pacientes con conducta de alto riesgo de infección por VIH como es el grupo de trabajadoras y trabajadores

sexuales (TS) tienen un real protagonismo en la distribución de los subtipos de VIH-1. En Asia se confirmó la introducción del subtipo E en Myanmar proveniente de Tailandia en militares infectados por TS femeninas (Nopkesorn *et al.*, 1998). Dos años más tarde, se reportó la aparición de recombinantes C/B' y C/B'/E en este país (Motomura *et al.*, 2000). Recientemente, se descubrieron en España subtipos A, G y formas recombinantes A / G nunca antes vistos en dicho país, provenientes de TS extranjeras (Motomura *et al.*, 2000). En consecuencia, las migraciones de TS femeninas a otros países representan un riesgo de transmisión de nuevas variantes genéticas de VIH con diferente característica de patogenicidad y virulencia.

En Sudamérica el subtipo B es el predominante (Montano *et al.*, 2005), sin embargo el subtipo F parece estar relacionado al grupo de TS en Argentina y Uruguay (Montano *et al.*, 2005; Viñoles *et al.*, 2005). En la población peruana, el subtipo B también es la variante más frecuente, con una prevalencia aproximada de 97%, mientras que el resto está representado en su mayoría por el subtipo F (Russell *et al.*, 2000; Laguna-Torres *et al.*, 2005), y algunos casos puntuales como los subtipos A, C y H (Russell *et al.*, 2000; Laguna-Torres *et al.*, 2005; Yabar *et al.*, 2012). En el Perú, los primeros estudios demostraron que la prevalencia del subtipo B en los TS fue de 100% (Yabar *et al.*, 2007), lo cual sugiere que este grupo de riesgo podría estar jugando un rol importante en la distribución y transmisión de la variante B en todo el país.

2.2. Infecciones mixtas de variantes genéticas de VIH

Es importante señalar que el contacto sexual sin protección entre sujetos previamente infectados puede originar una infección simultánea o a través del tiempo de variantes genéticas de VIH filogenéticamente diferentes. Este proceso denominado infección mixta puede ocurrir a través de una Superinfección o Co-infección (Smith *et al.*, 2005). La superinfección ocurre cuando una segunda variante de VIH vuelve a infectar a un individuo previamente infectado dentro del cual su organismo ya generó una respuesta inmunológica (Goulder & Walker, 2002). El término co-infección se refiere a

un proceso de infección de dos variantes en un tiempo más corto, el cual puede ocurrir en forma simultánea o a través del tiempo (Smith *et al.*, 2005). Estos eventos pueden generar una disminución de la respuesta inmunológica y consecuentemente acelerar el progreso a SIDA (Allen *et al.*, 2003). De manera importante, estos casos han ido en aumento, especialmente en África donde existe una alta variedad de subtipos genéticos (Blackard *et al.*, 2002). Generalmente, los primeros casos reportados se relacionaron a casos de conducta de riesgo (HSH, contacto sexual sin protección, múltiples parejas sexuales) (Zhu *et al.*, 1995, Jost *et al.*, 2002, Yang *et al.*, 2005). Sin embargo también se ha reportado infección mixta durante procedimientos de transfusión sanguínea (Díaz *et al.*, 1995) e intercambio de drogas intravenosas (Ramos *et al.*, 2002).

Casos de infecciones mixtas de diferentes subtipos como el B y F han sido reportados en sujetos brasileños con una prevalencia de 13% (Ramos *et al.*, 1999), sin embargo no se reportó evidencia de conducta de riesgo entre los participantes. Jost *et al.* (2002) reportaron la presencia de superinfección a partir de un individuo con múltiples parejas sexuales. En este estudio se determinó que en el momento de ocurrir la superinfección con la segunda cepa viral, los valores de carga viral aumentaron dramáticamente y el número de CD4 disminuyó de 800 a 400 células / mL.

Datos similares de progresión a SIDA fueron encontrados a partir de un estudio multicéntrico de sujetos con conducta de alto riesgo (Gottlieb *et al.*, 2004). De otro lado, la superinfección intrasubtipo B también fue evidente en un sujeto con tratamiento ARV, de quien no se reportó conducta de alto riesgo (Koelsch *et al.*, 2003). Diseños de cohorte realizados a partir de mujeres kenianas con conducta de alto riesgo determinó siete casos a partir de un total de 36 participantes, donde se determinó que el tiempo máximo para que ocurra una superinfección es de cinco años (Piantadosi *et al.*, 2007).

Con relación a TS, se halló evidencia de superinfección de cepas de VIH subtipo C en siete mujeres TS a partir de un total de 1850, incluyendo

recombinación de los subtipos A y C (Fang *et al.*, 2004). Asimismo, se identificaron dos casos de infección mixta a partir de una población de 147 TS (1.3%) (Manigart *et al.*, 2004), 1 caso de infección dual intrasubtipo a partir de 63 participantes (Gottlieb *et al.*, 2004) y finalmente seis casos de infección dual a partir de un grupo de 31 MTS de Sudáfrica (Grobler *et al.*, 2004).

En América se notificaron infecciones duales entre los subtipos B y F a partir de MTS de Puerto Rico (Flores *et al.*, 1999), mientras que en Argentina se detectaron infecciones mixtas pero enfocadas hacia otros grupos de riesgo como *hombres que tienen sexo con otros hombres* (HSH) (Fernandez-Medina *et al.*, 1999). Con respecto al estudio de infecciones mixtas de VIH-1 en el Perú, aún no se han realizado estudios utilizando la metodología estándar. Sin embargo, se dispone de información respecto a la identificación de patrones polimórficos mediante RFLP, de los cuales 10 (de un total de 12) fueron casos de mezcla de variantes genéticas a partir de una población de 110 TS, de los cuales el 70% (n = 7) presentó niveles de CD4 por debajo de 200 células / mL. Dentro de este mismo estudio no se encontraron evidencias de mezcla de variantes genéticas en población normal o de bajo riesgo de infección, demostrando que en TS la presencia de mezcla de variantes genéticas de este virus se presenta con mayor frecuencia que en población general (Yabar *et al.*, 2008).

En resumen, los reportes citados anteriormente demuestran que la presencia de infecciones mixtas es un evento común en poblaciones con conducta de alto riesgo, pero también puede afectar a individuos que forman parte de la población general, aunque con menor frecuencia. En todos los casos, las infecciones mixtas de VIH afectan la respuesta inmunológica acelerando el progreso a SIDA.

2.3. Formas recombinantes de VIH

La presencia de más de un subtipo genético circulando en una región representa un alto riesgo para la generación de formas recombinantes de VIH (Onafuwa-Nuga & Telesnitsky, 2009). Estas variantes se caracterizan

por presentar una mayor capacidad replicativa (Tebit *et al.*, 2007) y albergar mutaciones de resistencia a ARV provenientes de múltiples cepas resistentes (Rambaut *et al.*, 2004). En consecuencia el estudio de estas formas recombinantes es importante para efectos de Vigilancia Epidemiológica de nuevas variantes genéticas de VIH que podrían afectar de manera importante el estado clínico del paciente, ya que favorece el progreso a SIDA en un menor tiempo. Hasta la fecha se tienen reportadas 88 formas distintas de recombinación en VIH (Ver Base de Datos de VIH de Los Alamos disponible en la página web: <https://www.hiv.lanl.gov>, última visita 23 de enero de 2016).

En América se conocen hasta la fecha las siguientes *formas recombinantes circulantes* (CRF por su siglas en inglés) CRF01_AE, CRF02_AG, CRF09_cpx, CRF12_BF, CRF16_A2D, CRF28_BF, CRF29_BF, CRF38_BF, CRF20_BG identificadas originalmente en USA, Uruguay, Argentina, Ecuador, Brasil, Cuba (Melo *et al.*, 2012, Ruchansky *et al.*, 2009, Pérez *et al.*, 2006, De Sa Filho *et al.*, 2006, Hierholzer *et al.*, 2002). Debido a la alta frecuencia y diseminación agresiva de estas formas recombinantes, Sudamérica, conjuntamente con algunos países del Caribe, Africa y Asia, es considerada como una región *hot spot* en recombinación (Lau & Wong, 2013).

En el Perú, algunas formas recombinantes han sido caracterizadas intragenéticamente como el B/C, B/D, B/F, y K/F1/CRF12 a través del análisis del gen *pol* principalmente en población general (Hierholzer *et al.*, 2002; Yabar *et al.*, 2012). En el caso específico de TS, se logró identificar un recombinante intragenético denominado B/C mediante el análisis del gen *gag* (Yabar *et al.*, 2008).

2.4. Resistencia molecular a antirretrovirales

Hasta mediados de 2016, la ONUSIDA reportó cerca de 18 millones de personas con VIH provenientes de países de ingresos bajos y medianos recibiendo Terapia Antirretroviral Altamente Activa (TARGA) (UNAIDS,

2016b). Esta figura representa un aumento importante respecto a las 400,000 personas que recibían terapia ARV en el 2003 (UNAIDS, 2012). Con el objetivo de monitorear de manera adecuada la emergencia de resistencia a drogas para VIH, y conforme los países aumentaron su acceso a terapia ARV, la OMS inició en el 2004 un programa de vigilancia global de la resistencia a drogas ARV para VIH. Desde entonces, muchos países del mundo se vienen adhiriendo al programa de vigilancia de la OMS (WHO, 2016b). A pesar que el Perú ya administraba terapia ARV para personas con infección VIH desde el 2004 (MINSA, 2006), no ha reportado a la fecha ninguna información a la OMS sobre el perfil de resistencia a drogas ARV.

La resistencia a drogas ARV para VIH es de dos tipos: transmitida y adquirida. La resistencia de tipo transmitida ocurre en individuos que no estuvieron anteriormente infectados por VIH y que son infectados por virus resistentes a drogas. La resistencia a los ARV de tipo adquirida ocurre cuando aparecen mutaciones de resistencia por la presión selectiva impuesta por el tratamiento ARV recibido (WHO, 2016b).

Para conocer el perfil de resistencia se requiere realizar la metodología de Genotipificación de VIH, la cual es una técnica molecular basada en secuenciamiento de la región *pol* para el análisis de la proteasa y transcriptasa reversa (Shafer, 2002). Este procedimiento se ha vuelto muy frecuente en la práctica clínica privada (Garcia-Lerma *et al.*, 1996, Hirsch *et al.*, 1998).

En algunos países de Sudamérica como Argentina (http://www6.appliedbiosystems.com/press_releases/argentina, última visita 23 de enero de 2017), Brasil (Dantas *et al.*, 2002) y Chile se ha emprendido el estudio para la detección molecular de resistencia a ARVs en VIH-1 con aprobación del Ministerio de Salud (Ríos *et al.*, 2007).

Asimismo, viendo la necesidad de vigilar la resistencia en pacientes vírgenes de tratamiento, se iniciaron los estudios de resistencia transmitida en países de América Latina y el Caribe, cuya prevalencia se encontró en el rango de

2.8% a 8.1% entre los años 2003 y 2010 (Myers *et al.*, 2012). En tanto que en la región Andina fue de 10.5% (IC 95% 6.0% a 16.8%) durante los años 1999 y 2007 (Pineda *et al.*, 2012).

En el Perú, los primeros estudios de genotipificación de VIH se llevaron a cabo en población militar (Yabar *et al.*, 2006) y HSH (Lama *et al.*, 2006). A pesar que el tamaño muestral en la población de militares peruanos fue reducido, se logró identificar tres casos de resistencia adquirida (Yabar *et al.*, 2006), en cuanto que en población HSH la prevalencia de resistencia adquirida fue 31.3% mientras que la resistencia transmitida fue de 3.3% (Lama *et al.*, 2006).

Los datos hallados en estos estudios y el inicio de la era TARGA en el país, generó la necesidad de emprender la implementación de un Sistema Nacional de Genotipificación de VIH que permita cubrir la demanda de pacientes en todo el país. Esta misión fue asumida por el Instituto Nacional de Salud (INS) desde marzo de 2008 hasta la fecha, logrando que en los dos primeros años se contara con un laboratorio especializado para el secuenciamiento de VIH, además de un sistema informático para el reporte de resultados (NetLab) y la inclusión de más de siete mil pacientes tanto adultos como pediátricos (MINSA, 2006). Posteriormente, se continuó con la investigación y reporte de información relevante sobre resistencia transmitida primaria y secundaria a cargo de diferentes grupos de investigación provenientes de algunos Hospitales de Lima, con apoyo de investigadores extranjeros (Soria *et al.*, 2012; Rath *et al.*, 2013). La información de resistencia de estos estudios reveló una prevalencia de 1% de resistencia transmitida en población adulta (Soria *et al.*, 2012), mientras que en población pediátrica se observó la presencia de la mutación M184V en el 80% de los participantes con terapia TARGA, la que generó una alta resistencia adquirida a Inhibidores Nucleósidos de Transcriptasa Reversa (Rath *et al.*, 2013).

A pesar que se cuenta con información detallada sobre el perfil de resistencia de la población general, grupos de riesgo como HSH y población pediátrica,

a la fecha no dispone de publicaciones respecto a la situación de la resistencia primaria o secundaria de la población de TS, por lo que su estudio es requerido debido a las implicancias que este grupo tiene en la transmisión del virus.

2.5. Mutaciones en regiones conservadas y su rol en la replicación y capacidad infectiva del VIH

Recientemente se ha determinado que la diversidad y evolución del gen Gag guarda relación con la carga viral (capacidad replicativa) y progresión de la enfermedad (capacidad infectiva) en el hospedero humano a diferencia del gen env (Piantadosi *et al.*, 2009). Estos hallazgos podrían estar relacionados con las diferentes regiones conservadas de Gag que están directamente relacionadas con la capacidad replicativa del VIH. Con relación a este último, uno de los dominios de Gag correspondiente a la porción p24-p7 se caracteriza por presentar un región de dedos de Zinc, implicado en diferentes procesos de la replicación tales como la unión específica de la proteína Gag con el ARN viral (Urbaneja *et al.*, 1999), en la síntesis de la hebra complementaria durante la transcripción reversa (Cen *et al.*, 1999, Feng *et al.*, 1999) y en el ensamblaje y maduración del virus (Dawson & Yu, 1998).

En la naturaleza, no existen mayores estudios en lo que se hayan encontrado estas mutaciones, excepto un reciente hallazgo de mutaciones de tipo no conservativas en el dominio p24-p7 de Gag del VIH a partir de TS (Yabar *et al.*, 2008). Al hacer la búsqueda del dominio funcional de dedos de Zinc mediante un análisis de BLASTp (usando la secuencia de aminoácidos de las muestras de VIH), se encontró que muchos de estos dominios habían desaparecido, corroborando que las mutaciones identificadas en estas muestras eran importantes para mantener el dominio conservado de Gag. Sin embargo, no se ha demostrado si estas mutaciones también aparecen en cepas virales que infectan poblaciones humanas con diferente comportamiento de riesgo de infección por VIH.

De otro lado existe una región en Gag que por su naturaleza conservada ha sido denominada Región de Alta Homología (MHR por sus siglas en inglés),

cuya importancia ha sido determinada por estudios de mutagénesis sitio dirigida. Según estos estudios, se han encontrado evidencias que algunas mutaciones como la Q155T y E159K, tienen un efecto adverso en el procesamiento de los productos finales de Gag, truncando la formación de la estructura en forma de cono del virus y generando consecuentemente letalidad en el VIH (Mammano *et al.*, 1994; Dorfman *et al.*, 1994). Al respecto, es importante señalar la reciente identificación de una variante genética de VIH a partir de un TS, la cual presentó las mutaciones Q155T y E159K (Yabar *et al.*, 2008). Los datos virológicos del paciente revelaron una alta carga viral (CV=663244) y un bajo recuento de CD4 (83 cel / mL), lo cual sugiere que dichas mutaciones no afectaron la capacidad replicativa del VIH circulante en el paciente. Sin embargo se requieren hacer estudios de replicación *in vitro* mediante la construcción de virus quimera o recombinante para demostrar si la presencia de estas mutaciones influye de manera favorable o no sobre la capacidad replicativa del VIH.

En general, estos hallazgos muestran la necesidad de continuar y profundizar la investigación de estas mutaciones, mediante estudios comparativos entre poblaciones humanas con diferente comportamiento de riesgo de infección por VIH y demostrar las implicancias de estos cambios genéticos.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

La evolución molecular del VIH que infecta la población de trabajadoras y trabajadores sexuales (TS) ocurre de manera diferente que en no trabajadoras y trabajadores sexuales (NTS) debido a que los mecanismos de recombinación, subtipos genéticos, infecciones mixtas intra e inter subtipo y resistencia frente a los antirretrovirales se manifiestan de manera diferente en cada grupo de acuerdo a sus características epidemiológicas.

3.2. Objetivo general

Describir los eventos relacionados con la evolución molecular del VIH-1 en sujetos peruanos TS y NTS infectados de Lima y Callao.

3.3. Objetivos específicos

- 3.3.1.** Realizar la amplificación de los marcadores genéticos *gag*, *pol* y *env* del VIH mediante PCR.
- 3.3.2.** Analizar la diversidad genética del VIH mediante los genes anteriormente mencionados.
- 3.3.3.** Identificar los subtipos a través de análisis filogenético.
- 3.3.4.** Analizar los eventos de recombinación intra e intergenética.
- 3.3.5.** Detectar eventos de infecciones mixtas de sub-poblaciones de VIH.
- 3.3.6.** Determinar el tropismo genotípico del VIH.
- 3.3.7.** Identificar mutaciones puntuales en sitios conservados del gen *gag* relacionados con la capacidad replicativa del virus.
- 3.3.8.** Hallar eventos de hipermutación intra e intergénica.
- 3.3.9.** Detectar mutaciones puntuales relacionadas con resistencia a los antirretrovirales.
- 3.3.10.** Determinar si los factores de riesgo de la población de TS y NTS (sexo, trabajo sexual, consumo de drogas recreativas, tratamiento ARV, capacidad replicativa del virus y estado inmunológico del paciente), influyen en la evolución molecular del VIH

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

La presente tesis corresponde a un estudio descriptivo exploratorio de corte transversal.

4.2. POBLACIÓN Y MUESTRA

4.2.1. Población

Para el desarrollo del estudio en general, se dispuso de una población de trabajadoras y trabajadores sexuales (TS) definida a través de los registros de atención (nombre y DNI) que figuran en el Centro Especializado en Infecciones de Transmisión Sexual (CERITS) “Alberto Barton” (También en Clark *et al.*, 2008). El marco muestral de esta población según sus registros es de 400 sujetos. Asimismo, se consideró una población de pacientes de la cual se tiene la certeza de no existir la práctica del trabajo sexual (comunicación personal de médico responsable Rafael Rodríguez), siendo sus características de comportamiento sexual diferentes a los TS. En consecuencia, esta población fue denominada como no trabajadoras y trabajadores sexual (NTS) cuyo marco muestral fue de aproximadamente 200 sujetos y que estuvieron atendidos bajo supervisión del Ministerio de Defensa (Tabla 1).

4.2.2. Muestra

Considerando el marco muestral anteriormente descrito, y de acuerdo a la prevalencia de VIH por grupo de riesgo, se consideró para el grupo de TS una muestra mínima de 60 participantes; mientras que para el grupo de NTS fue de 20 participantes. El tiempo para alcanzar el tamaño mínimo esperado de participantes fue de 8 meses.

4.2.3. Criterios de selección

a) Sujetos Trabajadores Sexuales (TS)

Para el caso de TS, se logró reclutar una población de 61 participantes (52 de sexo masculino identificados como HSH transgénero y 9 de sexo

femenino heterosexuales), cuyas características epidemiológicas se detallan en la Tabla 1.

Los criterios de selección fueron los siguientes:

Criterios de Inclusión

- Que acepten participar en el estudio previo consentimiento informado, el cual se ciñe a los incisos 25 y 26 de la Declaración de Helsinki donde se estipula que el consentimiento se solicitará una vez que el paciente haya entendido su participación en el estudio y que puede abandonarlo sin que ello afecte sus derechos (World Medical Association, 2013).
- De ambos sexos, mayores de edad.
- Con diagnóstico de ELISA reactivo o confirmatorio de infección por VIH-SIDA.
- Que hayan ejercido el trabajo sexual dentro de los últimos 5 años.

Criterios de Exclusión

- De procedencia y/o identidad dudosa o indeterminada.
- Que presenten alteración mental.

b) Sujetos No Trabajadores Sexuales (NTS)

Para el caso de NTS, se logró reclutar 32 participantes, (19 de sexo masculino y 13 de sexo femenino, ambos grupos heterosexuales). Los criterios de selección fueron los siguientes:

Criterios de Inclusión

- Sujetos que acepten participar en el estudio previo consentimiento informado. En caso que el paciente acepte participar se le leerá el inciso 24 al 28 de la Declaración de Helsinki.
- Sujetos de ambos sexos mayores de edad.
- Sujetos con diagnóstico de ELISA reactivo o confirmatorio de infección por VIH-SIDA.
- Sujetos que nunca hayan ejercido el trabajo sexual.

Criterios de Exclusión

- Pacientes con alteración mental.

Las características epidemiológicas de los grupos TS y NTS se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1
Características y factores de riesgo de los participantes del estudio

CARACTERÍSTICAS	TS		NTS		Total (porcentaje)
	Varón	Mujer	Varón	Mujer	
Participantes por género: n(%)	52 (55.9)	9 (9.7)	19 (20.4)	13 (14)	93 (100)
Promedio de edad: n	35.1	33.4	38.3	41.5	37.1
Ejerce el trabajo sexual: n (%)	43 (82.7)	5 (55.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	48 (51.6)
Contacto con clientes extranjeros en el Perú: n (%)	18 (34.6)	1 (11.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	19
Ejerció la prostitución en el extranjero: n(%)	5 (9.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5
Contacto bisexual: n(%)	1 (1.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1
Consumo de drogas: n (%)	33 (63.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	33
Consumo de ARV: n(%)	14 (26.9)	3 (33.3)	11 (57.9)	1 (5.3)	29
ITS (Excepto VIH)	6 (11.5)	2 (22.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	8
CD4 < 200 células / ml: n(%)	(n = 43) 23	(n = 5) 4	(n = 15) 14	(n = 6) 4	45
TBC pulmonar n(%)	1 (1.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.1)

Nota: Los participantes TS varones corresponden a varones transgénero (ver definición en glosario de términos). TS: Trabajador(a) sexual. NTS: No trabajador(a) sexual. ITS: Infección de transmisión sexual, CD4: Recuento de células CD4 en sangre.

c) Muestra biológica

Muestra infectada con VIH

El tipo de muestra biológica para el análisis del material genético del virus correspondió a sangre venosa tratada con anticoagulante obtenida a partir del antebrazo de los participantes.

VIH-1 subtipo B de referencia

Como ADN control del PCR y del ensayo de movilidad de heteroduplex (HMA) se incluyeron plásmidos recombinantes conteniendo un inserto de 550 pb del gen *env*. Los insertos de cada plásmido correspondieron a cepas de VIH-1 de referencia desde el subtipo A al J. Los plásmidos recombinantes fueron proveídos por el HIV Reagent Program del National Institute of Health (NIH) de los EEUU.

Secuencias reportadas del gen gag y env de VIH-1 grupo M

Se incluyeron en el estudio 35 secuencias de referencia del gen *gag* y 50 secuencias de referencia del gen *env*. Todas las secuencias fueron obtenidas de la base de datos de VIH del Laboratorio Nacional de VIH de los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov/content/index>).

4.3. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

4.3.1. Determinación del subtipo de VIH. Una variante genética de VIH fue considerada por pertenecer a un subtipo determinado, luego que conformara un clado filogenético con un grupo de VIH de referencia de subtipo conocido, con un *bootstrap* > 60% mediante análisis de los genes *gag*, *env* o *pol*.

4.3.2. Virus recombinante intragenético e intergenético. Se consideró como VIH recombinante intragenético cuando la secuencia correspondiente a los genes *gag*, *env* o *pol* brindó información de dos o más subtipos diferentes con cualquiera de los cinco métodos de recombinación analizados por el programa RDP versión 1.08 (Martin, 2005) con un valor $p < 0.05$ y un *bootstrap* de 1000 réplicas. De otro lado, una variante genética de VIH fue considerada recombinante intergenética cuando por análisis filogenético de los marcadores *gag*, *env* y *pol* mostró información de subtipos diferentes en una misma muestra de VIH con un *bootstrap* > 75% o bien, diferente distribución de los clados en el árbol filogenético para una misma muestra (Delwart *et al.*, 1995).

4.3.3. Infección mixta. Se consideró como infección mixta a la presencia de una o varias bandas de heterodúplex a partir de una muestra de VIH.

4.4. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

4.4.1. Cuestionarios y fichas de consentimientos informados

Para realizar el reclutamiento de los participantes se realizó coordinaciones con el personal médico del Centro de Salud “Alberto Barton” de la Dirección de Salud (DISA) del Callao, quienes se encargaron de la consejería y el llenado de los cuestionarios y consentimiento informado.

Los cuestionarios abordaron preguntas respecto a la edad, estado de salud, ejercicio actual del trabajo sexual, consumo de estupefacientes, experiencia de trabajo sexual en el extranjero, posible contacto con clientes extranjeros y administración de terapia antirretroviral actual. Las fichas fueron codificadas como BM en caso de ser pacientes de sexo masculino o BF para sexo femenino seguido del número de orden correspondiente. Para cada rótulo se usó un color distinto para cada sexo siendo rojo para mujeres y azul para hombres. Una vez obtenida la información, se procedió a la toma de muestra sanguínea correspondiente.

4.4.2. Extracción de sangre

El volumen extraído de sangre venosa fue de 5 mL el cual fue obtenido del antebrazo derecho o izquierdo mediante una punción utilizando una aguja hipodérmica insertada a un tubo de extracción de sangre al vacío con inhibidor de coagulación. La sangre fue almacenada en cajas de tecnopor sin hielo y luego trasladadas al Instituto Nacional de Salud (INS) para su posterior análisis.

4.5. PLAN DE ANÁLISIS

4.5.1. Aislamiento del material genético

Para la extracción de ADN total se utilizó el Kit Qiamp DNA Mini (QIAGEN). Para ello, la sangre fue separada en alícuotas, destinadas para la realización de las pruebas moleculares, para el recuento de CD4/CD8 y carga viral. Esta última prueba fue realizada por el Laboratorio de VIH del Instituto Nacional de Salud.

El procedimiento fue llevado a cabo según recomendaciones del fabricante QIAGEN mezclando 200 μ L de sangre con 20 μ L de Proteinasa K (10 μ g / μ l) en un tubo de 1.5 mL. Posteriormente se añadió a la mezcla 200 μ L de *Buffer* de lisis AL y se procedió a homogenizar vigorosamente. La mezcla fue incubada a 56°C por 10 minutos en baño maría modelo 1166 (VWR Scientific). Seguidamente, la mezcla fue añadida dentro de pequeñas columnas (minicolumnas) de purificación las cuales fueron ensambladas en tubos de 1.5 mL y luego sometidas a centrifugación a 8000 rpm por 1 minuto (centrífuga Eppendorf modelo 5417C). Las impurezas fueron removidas de la minicolumna con lavados mediante centrifugación usando el *Buffer* AW1 (8000 rpm por minuto) y posteriormente el *Buffer* AW2 (14000 rpm por 3 minutos). Seguidamente se añadió 150 μ L del *Buffer* AE o agua dentro de la minicolumna ensamblada a un tubo de 1.5 mL de capacidad. Todo el sistema fue posteriormente sometido a una centrifugación de 8000 rpm para generar el desprendimiento del material genético de las minicolumnas hacia el tubo de 1.5 mL facilitado por el *Buffer* AE o agua. Finalmente, los tubos conteniendo la solución eluída fueron almacenados a -20°C para su posterior utilización.

4.5.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Todos los procedimientos de PCR fueron realizados usando el termociclador Perkin Elmer Applied Biosystem modelo 9700. Cada reacción fue llevada a cabo usando diferentes sets de *primers* de acuerdo al gen de interés (Tabla 2).

a) Amplificación de la porción p24-p7 del gen gag

Este fragmento genético fue seleccionado para el análisis de subtipos, recombinación molecular y mutaciones relacionadas con la capacidad replicativa. Para tal fin se emplearon las especificaciones descritas previamente por Van der Auwera & Heyndrick, 2000, la cual consta de dos rondas de amplificación:

- Primera ronda de PCR, se utilizaron tubos de 200 μ L de capacidad debidamente rotulados conteniendo concentraciones

finales de los siguientes componentes: *Buffer* de reacción de PCR II (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.3), 2.5 mM de MgCl₂, 0.8 mM de mezcla de deoxinucleótidos trifosfatos (200 μM de dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 0.2 pmoles de los *primers* H1G777 y H1P202, 0.25 U de Enzima Taq ADN Polimerasa (Applied Biosystem) y 100 ng de ADN molde. Las condiciones de ciclaje fueron: 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos y 72°C por 2 minutos y 1 ciclo final de 72°C por 7 minutos y por último una temperatura de almacenaje de 4°C. Los tubos fueron mantenidos a esta temperatura hasta el momento de dar inicio al segundo PCR; o bien fueron almacenados a -20°C por toda la noche. Para la amplificación de los plásmidos de referencia de los subtipos se omitió la primera ronda de PCR debido a que los productos clonados en cada plásmido no presentan la región de hibridación para los *primers* H1G777 y H1P202.

- Segunda ronda de PCR, en el cual se mezclaron concentraciones finales de los siguientes reactivos: *Buffer* de reacción de PCR (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.3), 2.5 mM de MgCl₂, 0.8 mM de mezcla de deoxinucleótidos trifosfatos (200 μM de dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 0.4 pmoles de los *primers* H1Gag1584 y g17, 0.25U de Enzima Taq ADN Polimerasa (Applied Biosystem) y 2μL de reacción de la primera ronda.

Las condiciones de ciclaje fueron: tres ciclos iniciales de 94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, seguido de 32 ciclos restantes de 94°C por 30 segundos, 45°C por 30 segundos y 72°C por 2 minutos. Se realizó una extensión final de 72°C por 7 minutos. Finalmente se programó una temperatura de almacenaje a 4°C. Los tubos fueron posteriormente almacenados a -20°C. Para el caso de los plásmidos de referencia, no fue necesaria la modificación de los tres primeros ciclos según recomendaciones de Van der Auwera & Heyndrick, 2000. Esta modificación permite incrementar la afinidad

de los *primers* en el ADN molde de la muestra, lo cual no es necesario para el caso de las cepas de referencia.

b) Amplificación de la región C2-V5 del gen env

Esta región genética fue seleccionada para el estudio de los subtipos, recombinación molecular e infecciones mixtas de variantes genéticas de VIH. El proceso de amplificación se llevó a cabo siguiendo las especificaciones de Delwart *et al.* (1995), tal como se describe a continuación:

- Primera ronda de PCR. se utilizaron tiras de tubos conteniendo concentraciones finales de los siguientes componentes: *Buffer* de reacción de PCR (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.3), 1.25 mM de MgCl₂, 0.8 mM de mezcla de deoxinucleótidos trifosfatos (200 µM de dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 1 pmol de los *primers* ED5 y ED12, 0.25 U de Enzima Taq ADN Polimerasa (Eppendorf) y 100 ng de ADN genómico. Las condiciones de ciclaje fueron: Tres ciclos iniciales de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, seguido de 32 ciclos restantes de 94°C por 15 segundos, 55°C por 45 segundos y 72°C por 1 minuto. Se realizó una extensión final de 72°C por 5 minutos y se programó a la temperatura de almacenaje a 4°C. Finalmente los tubos fueron mantenidos a -20°C.
- Segunda ronda. se añadieron concentraciones finales de los siguientes componentes: *Buffer* de reacción de PCR (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.3), 1.4 mM de MgCl₂, 0.8 mM de mezcla de dNTPs (200 µM de dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 2 pmol de los *primers* ED31 y ED33, 0.25 U de Enzima Taq ADN Polimerasa (Eppendorf) y un volumen de 1 µL de reacción de la primera ronda. Para lograr la amplificación del gen *env*, se tomó 1 µL de reacción de la segunda ronda de PCR como ADN molde. Las condiciones de ciclaje fueron: Tres ciclos iniciales de 94°C por 1 minuto, 55°C

por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, seguido de 32 ciclos restantes de 94°C por 15 segundos, 55°C por 45 segundos y 72°C por 1 minuto. Se realizó una extensión final de 72°C por 5 minutos y se programó a la temperatura de almacenaje a 4°C. Finalmente los tubos fueron mantenidos a -20°C.

c) Amplificación de la región Pol que codifica la proteasa y transcriptasa reversa (prt y tr)

Esta región fue estudiada para la identificación de las mutaciones puntuales que confieren resistencia molecular a los antirretrovirales en VIH-1. Para tal fin se emplearon dos sistemas de PCR. El primero descrito por Boden *et al.* (1999) y Wilson *et al.* (2000), y el segundo desarrollado recientemente por el grupo de investigación del Hospital Stanford en EEUU (HIV genotyping manual, 2008). El objetivo de incluir varias metodologías de amplificación fue el de incrementar la sensibilidad del método y poder obtener la mayor cantidad de información posible de esta región de interés, la cual se ve disminuida debido al alto porcentaje de mutaciones de resistencia y al polimorfismo del VIH.

El primer sistema empleado en este estudio descrito por Boden *et al.* (1999) y Wilson *et al.* (2000), consistió en la amplificación por separado de los genes *prt* (que codifica la proteasa) y *tr* (que traduce la región catalítica de la transcriptasa reversa) a través de un ensayo de Heminested-PCR.

Para la amplificación del gen *prt*, se realizó una primera ronda de amplificación para la cual se llevó a cabo una mezcla de reacción conteniendo 1X de *Buffer* de reacción (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.3), 5mM de MgCl₂, 0.8 mM de mezcla de deoxinucleótidos trifosfatos (200 µM de dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 1 pmol/µL de los *primers* PT-1 y PT-2, y 0.025 ng/µL de enzima Taq ADN polimerasa.

Para la segunda ronda de amplificación se usaron los mismos reactivos y concentraciones con excepción del *primer* PT-1 el cual fue reemplazado

a la misma concentración por el *primer* PT-3; en tanto que el MgCl_2 fue utilizado en esta ronda a una concentración de 2.56 mM. En su conjunto, el uso de los *primers* mencionados permite amplificar una región de 377 pb que incluye todo el gen *prt* (297 pb).

Tabla 2. Lista de primers usados durante la realización de la presente tesis

Nombre	Secuencia	Posición en el genoma	Gen amplificado / tamaño en pb	Referencia
H1G777	5'-TCACCTAGAACTTTGAATGCATGGG-3'	777-801		Vander
H1P202	5'-CTAATAC TGTA TCA TC TGC TCC TGT-3'	1874-1898		Auwerá &
H1Gag1584	5'-AAAGATGGATAA TCC TGGG-3'	1123-1141		Heyndrick,
g17	5'-TCCACATTTCCAAACAGCCCC TTTT-3'	1566-1589		2000,
ED5	5'-ATGGGATCAAAAGCC TAAAGCCATGTG-3'	6556-6581		
ED 12	5'-AGTGC TTC TGTCTGCTGCCAAGAACCCAAAG-3'	7792-7822		Delwart et al.,
ED31	5'-CCTCAGCCATTACACACAGGCC TGTCCAAAG-3'	6816-6844		(1995)
ED33	5'-TTACAGTAGAAAAATTCCTCC-3'	7359-7380	env- C2-V5 /550	
NE1	5'-CCTACTAACTTCTGTATGTCA TTGACAGTCCAG CT-3'	3300-3334	Región catalítica de la	Wilson et al.,
pol A	5'- TTGGTTGCAC TTTAAATTTTCCCATTAAGTCC TATT-3'	2530-2564	transcriptasa	(2000)
B	5'-GGATGGAAAGGATCACC CG-3'	3003-3020	reversa /339	
PT-1	5'-ACCAAGAGCCCAACAGCCCCCACC A-3'	2147-2168		Boden et al.,
PT-2	5'-C TTTTGGGCCATCCATTCCTGGC-3'	2587-2609	proteasa / 377	(1999)
PT-3	5'-GAAGCAGAGCCCGATAGACAA GG-3'	2233-2255		
RT-21	5'-CTGTATTCTGCTATTAAGTCTTTTGTGGG-3'	2028-2050	Unión de la	
1243	5'-ACT AAG GGA GGG GTA TTG ACA AAC TC-3'	3792-3817	proteasa y	Yabar et al.,
MAW-26	5'-TTG GAA ATG TGG AAA GGA AGG AC-3'	2028-2050)	transcriptasa	(2012)
PRO-1	5'-CAG AGC CAA CAG CCC CAC CA-3'	2147-2166	reversa (1500	
RT-20	5'-CTG CCA GTT CTA GCT CTG CTT C-3'	3441-3462	pb)	
1205	5'-CCA GGT GGC TTG CCA ATA CTC TGT CC-3'	3754-3779		

Para el caso del gen *tr*, se preparó una mezcla de reacción conteniendo 1X de *Buffer* de reacción (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.3), 3mM de MgCl₂, 0.2 mM de mezcla de deoxinucleótidos trifosfatos (200 μM de dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 2.5 ng/μL del *primer* Ne1 y 2.5 ng/μL del *primer* A y 0.025 ng/μL de enzima Taq ADN polimerasa. Durante la segunda ronda se usaron los mismos reactivos y concentraciones con excepción del *primer* A el cual fue reemplazado por el *primer* B, y la concentración final de MgCl₂ fue de 2mM. El proceso final permitió la amplificación de una región de 339 pb correspondiente a la porción catalítica del gen *tr*.

La segunda metodología desarrollada en el Hospital de Stanford (HIV genotyping manual, 2008) en EEUU consistió en un ensayo de PCR y Nested PCR, para la amplificación de un fragmento de 1700 pb (1^{ra} ronda) y de 1500 pb (2^{da} ronda).

- Primera ronda. Se preparó una mezcla conteniendo concentraciones finales de los siguientes componentes: *Buffer* de Reacción 1X (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.3), 1.5 mM de MgCl₂, 0.8 mM de mezcla de dNTPs (200 μM de dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 0.5 pmol de *primer* RT-21, 0.5 pmol de *primer* 1243, 1 pmol de *primer* MAW-26 y 1.25 U de enzima Taq Polimerasa. Las condiciones de amplificación, fueron las siguientes: 1 ciclo de denaturación inicial de 94°C por 2 minutos, 40 ciclos de 94°C por 15 segundos, 55°C por 20 segundos, 72°C por 2 minutos y 1 ciclo de extensión final de 72°C por 10 minutos.
- Segunda ronda. Se utilizaron concentraciones finales de los siguientes reactivos: *Buffer* de Reacción 1X (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.3), 1.5 mM de MgCl₂, 0.8 mM de mezcla de dNTPs (200 μM de dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 0.2 pmol del *primer* PRO-1, 0.1 pmoles de RT-20 y 0.1 pmoles de 1205 y 1.25 U de enzima Taq Polimerasa. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: Denaturación inicial de 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de 94°C por 15 segundos, 63°C por 20 segundos y 72°C por 2 minutos, una extensión

final de 72°C por 10 minutos y finalmente una temperatura de almacenaje de 4°C. En la Figura 1 se ilustran las posiciones de los *primers* en el genoma del VIH.

d) Control de calidad del ADN

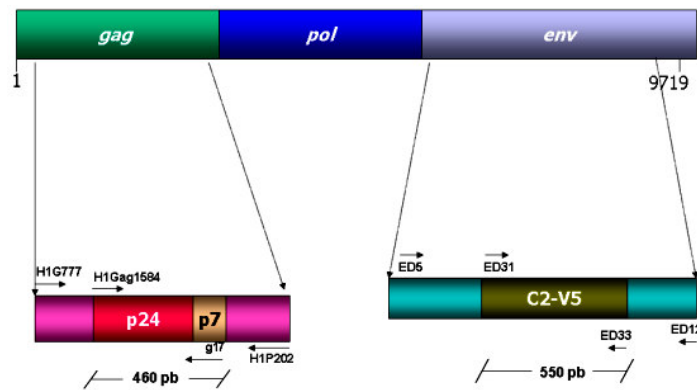
Todas las muestras de ADN extraídas fueron sometidas a un proceso de control de calidad a través de la amplificación del gen de la β -globina, un gen constitutivo presente en el genoma humano. Para ello se realizó la mezcla de PCR conteniendo las concentraciones finales de los siguientes reactivos: *Buffer* de Reacción 1X (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.3), 2 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de dNTP, 0.1 pmol de *primer* 1, 0.1 pmol de *primer* 2, y 0.02 U de enzima Taq Polimerasa. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo de denaturación inicial de 95°C por 7 minutos, 60 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 1 minuto, 72°C por 7 minutos y 1 ciclo de extensión final de 72°C por 7 minutos.

4.5.3. Electroforesis de ADN

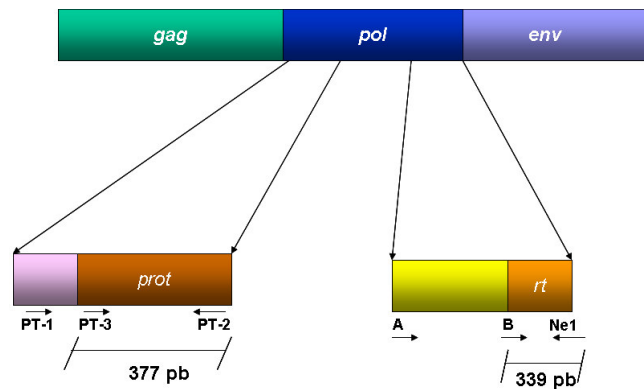
Para la separación de los productos de amplificación de los genes *gag* y *env*, se utilizaron geles de agarosa de la marca BIORAD al 1.5 %. Los productos de amplificación fueron separados usando una minicámara de electroforesis horizontal GIBCO modelo Horizon 58. Seguidamente, la electroforesis se llevó a cabo bajo un sistema sumergido en *Buffer* de electroforesis TAE 1X (40 mM de Tris acetato y 1 mM de EDTA) a 100 V por 55 minutos.

Para la visualización de los fragmentos de ADN, se removió el gel de la cámara y se sumergió en un recipiente conteniendo 5 μ g / mL de bromuro de etidio por un espacio de 5 minutos. El ADN fue visualizado con luz UV y registrados usando una cámara de fotografía Polaroid MP4+. El tamaño de las bandas en pares de bases fue discriminado usando los marcadores de ADN estándar de 100 pb ladder y 1 Kb ladder (Promega).

A



B



C

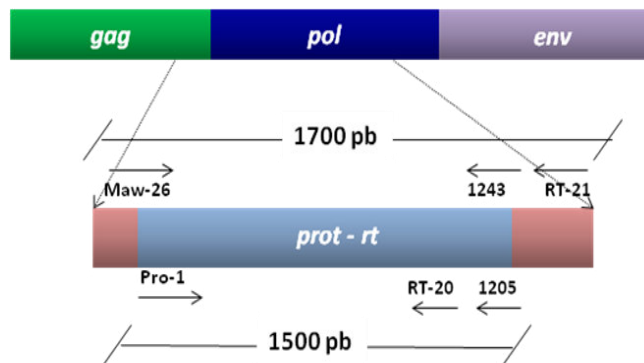


Figura 1. Ubicación de los *primers* que amplifican las porciones genéticas de A) 460 pb del gen *gag* (p24-p7), 550 pb del gen *env* (C2-V5), B) 400 pb del gen *prt*, 337 del gen *rt*, y C) 1500 pb-1700 pb de la región *pol* (*prot-tr*). La figura fue diseñada en este trabajo con base al genoma de la cepa HXB2 (Número de acceso en el GenBank: K03454)

4.5.4. Ensayo de Movilidad de Heterodúplex (HMA)

Los productos de amplificación, luego de ser analizados por electroforesis en geles de agarosa, fueron seleccionados y sometidos a HMA (Manigart *et al.*, 2004). Para tal efecto se prepararon productos de PCR del gen *env* incluyendo todos los subtipos de referencia mencionados en materiales. Se utilizó un tubo de 0.2 mL de capacidad para mezclar un volumen de 20 µL de producto de PCR con 2.2µL de *Buffer* de alineamiento de heteroduplex 10X (1M de NaCl, 100 mM de Tris HCl, pH 7.8 y 20 mM de EDTA). Seguidamente la mezcla fue sometida a 97°C por 3 minutos e inmediatamente incubada en un baño de hielo (0°C).

4.5.5. Electroforesis para el análisis de movilidad de heterodúplex (HMA)

Para realizar la identificación de los subtipos de VIH por HMA, los productos de PCR fueron separados por electroforesis en un gel no denaturante conteniendo 5% de poliacrilamida, TBE 1X (88 mM Tris borato, pH 8; 8.9 mM ácido bórico y 2 mM de EDTA), 0.1% de APS y 0.066% de TEMED bajo un sistema sumergido conteniendo *Buffer* de electroforesis TBE 1X. La electroforesis se llevó a cabo en una cámara de electroforesis vertical modelo V16-2 (GIBCO/VRL) de 19 cm de altura x 19.5 cm de ancho a una temperatura no superior a los 22°C a 250 V por 3 horas y 30 minutos. Posteriormente el gel fue removido de la cámara para ser incubado en solución conteniendo 1 µg/mL de bromuro de etidio por un tiempo de 20 minutos. El gel fue colocado y registrado directamente en un documentador de geles modelo BioDoc-It System (UVP Inc.). El tamaño de los heterodúplex fueron discriminados usando el marcador de ADN estándar de 1Kb ladder (Promega).

4.5.6. Purificación de ADN

a) Purificación directa a partir de producto amplificado

Esta metodología fue realizada principalmente para la purificación de producto de PCR libre de inespecificidades y secuenciamiento directo. El procedimiento fue realizado utilizando el producto QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) siguiendo las recomendaciones de los

fabricantes. Para tal propósito, se utilizó un volumen de 100 µL de producto amplificado el cual fue mezclado con 3 volúmenes del *Buffer* PB. La mezcla fue colocada en una minicolumna con el fin de retener el ADN en una matriz de resina. Seguidamente la minicolumna fue centrifugada a 13000 rpm por 1 minuto y la solución libre de ADN fue descartada en un tubo de colección. Posteriormente se realizó el lavado colocando la minicolumna en un nuevo tubo de colección. Se añadió 750 µL de *Buffer* PE y se centrifugó a 13000 rpm por 1 minuto. La suspensión fue descartada en un tubo de colección y se colocó la minicolumna en un tubo de 1.5 mL estéril. Para recuperar el ADN de la minicolumna, se añadió 50 µL de *Buffer* de elusión EB (10 mM Tris·Cl, pH 8.5) en el centro de la misma y se incubó por 1 minuto. Luego se centrifugó a 13000 rpm por 1 minuto y el ADN contenido en el *Buffer* fue utilizado inmediatamente para la cuantificación.

b) Purificación a partir de gel low melting

Todos los productos de PCR utilizados para secuenciamiento o clonación fueron purificados a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión o *low melting* (MERCK) al 1%. Para tal fin, se utilizó el kit de purificación QIAquick Gel Extraction (Qiagen) y el procedimiento fue llevado a cabo de acuerdo a las indicaciones de los fabricantes. Los productos a ser purificados fueron sometidos a electroforesis bajo un voltaje de 100 V en *Buffer* de corrida electroforética TAE 1X previamente enfriado a 4°C, usando un sistema sumergido tal como fue descrito anteriormente.

Luego de una incubación por 5 minutos en bromuro de etidio, el gel de agarosa fue lavado en agua destilada por 5 minutos. Seguidamente las bandas de interés fueron visualizadas por luz UV a baja intensidad (302 nm) e inmediatamente extraídas del gel de agarosa utilizando laminillas de vidrio. Las porciones de agarosa *low melting* conteniendo el ADN de interés, fueron transferidas a tubos de 1.5 mL siliconizados (EPPENDORF). Inmediatamente después, se determinó el peso de cada tubo conteniendo la agarosa con el fin de calcular el volumen de *Buffer* QG a ser utilizado. Luego, la mezcla fue incubada en baño maría a 55

°C por 10 minutos empleando intervalos de agitación vigorosa cada 3 minutos. Luego de corroborar que la suspensión estuvo completamente líquida, se añadió 1 volumen de isopropanol puro y se mezcló vigorosamente. Para la inmovilización del ADN, la mezcla fue transferida a minicolumnas de purificación del kit de purificación. Las minicolumnas conteniendo la mezcla fueron centrifugadas a 13000 rpm por 1 minuto y luego transferidas a unos tubos de colección limpios. Seguidamente se añadió 500 µL de *Buffer* QG y se volvió a centrifugar a 13000 rpm por 1 minuto. El volumen retenido de *Buffer* QG en los tubos de colección fue eliminado y la minicolumna fue transferida a un nuevo tubo de colección para el lavado del ADN con 750 µL de *Buffer* PE. Luego de una centrifugación a 13000 rpm por 1 minuto, la minicolumna fue transferida a un tubo de 1.5 mL para la recuperación del ADN. Para tal fin, se añadió 1 volumen de 50 µL de *Buffer* de elusión EB (10 mM Tris·Cl, pH 8.5) y se realizó una última centrifugación a 13000 rpm por 1 minuto. El ADN resuspendido en *Buffer* EB fue utilizado para determinar su concentración por electroforesis.

c) Purificación a partir de gel de poliacrilamida por el método Crush & Soak

Este procedimiento fue realizado para la purificación de ADN a partir de procedimientos de HMA. Para tal efecto se recurrió a la metodología de *Crush and Soak* (Sambrook & Russell, 2006) por la cual el ADN fue sometido a electroforesis por HMA (Ver "*Electroforesis para el análisis de movilidad de heterodúplex (HMA)*"). Una vez que el heterodúplex de ADN fue identificado, se procedió a realizar la separación de la bandas de ADN a través de un corte en el gel de poliacrilamida utilizando una laminilla de vidrio. El trozo de poliacrilamida fue colocado en un tubo de 1.5 mL conteniendo 2 volúmenes de *Buffer* de elusión de poliacrilamida (0.5M Acetato de amonio, 1mM EDTA pH = 8.0). Seguidamente, el gel fue reducido a trozos más pequeños mediante procedimiento mecánico utilizando un estilete estéril (*crush*). El tubo conteniendo los trozos del gel y el *Buffer* de elusión fue incubado a 37°C por 16 horas (*soak*) con movimiento constante utilizando una placa térmica (Thermomixer).

Culminada la incubación, se sometió a centrifugación de 15000 rpm por 1 minuto a 4°C. El sobrenadante fue recuperado y transferido a un nuevo tubo de 1.5 mL. Los trozos de poliacrilamida remanentes fueron suspendidos en 0.5 mL de *Buffer* de elusión y mezclados vigorosamente. Luego, fueron precipitados por centrifugación a 15000 rpm por 1 minuto a 4°C. Este sobrenadante fue recuperado y mezclado con el primero. Seguidamente, se calculó el volumen final del sobrenadante y se procedió a su purificación utilizando el kit QIAquick PCR Purification.

4.5.7. *Determinación de la concentración de producto de PCR*

Para el cálculo de la concentración de los productos de PCR a partir de bandas de 1500 pb se usó el marcador de peso molecular Low Mass Ladder (Invitrogen) mientras que para productos menores de 550 pb se utilizó el marcador Lonza DNA QuantLadders (Lonza). Para medir la intensidad de la fluorescencia de las bandas de ADN se utilizó el equipo documentador de geles Chemidoc XRS (Biorad) a través del uso del programa Quantity One versión 4.6.9. Este programa permitió registrar el volumen e intensidad de la banda de cada uno de los marcadores estándar cuya concentración es conocida para interpolarlos con los valores de volumen e intensidad de las muestras. De esta manera se obtuvo la concentración de las bandas de interés en valores expresados en ng/μL.

4.5.8. *Clonación molecular*

Todos los procedimientos de clonación molecular fueron realizados para propagar los plásmidos comerciales de los subtipos de referencia y para demostrar la presencia de infecciones mixtas observadas en los productos de PCR que presentaron heterodúplex en el HMA. Para tal fin se utilizaron vectores plasmídicos con un residuo de Timina en el extremo 3', el cual permitió insertar directamente el producto de PCR gracias al residuo de Adenina presente en su extremo 5'. Este residuo es añadido por la actividad terminal transferasa de las enzimas termoestables como el caso de la enzima Taq ADN Polimerasa (Robles & Doers, 1994), la

cual fue utilizada en el presente estudio. Para insertar el gen en el plásmido se utilizaron dos métodos:

a) Clonación por ligación directa

Para este procedimiento se utilizó el vector plasmídico pGEMT Easy. Para tal efecto, se utilizó un ratio molar inserto: vector de 3:1 según lo recomendado por sus fabricantes, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{ng vector} \times \text{kb de inserto} \times 3}{3.0 \text{ kb}} = \text{ng de inserto}$$

La reacción de ligación fue llevada a cabo en un volumen final de 10 µL considerando los siguientes componentes: 1X de *Buffer* de ligación (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 7 mM de MgCl₂ y 1 mM DTT), 50 ng de Vector pGEMT Easy, 20.95 ng de inserto y 1.5U de enzima ligasa T4. Asimismo, se llevó a cabo la ligación del plásmido pGEMT Easy sin inserto como control del sistema y del plásmido pUC 18 sin inserto como control de eficiencia. Las reacciones de ligación de los controles fueron llevadas a cabo utilizando las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Todas las reacciones de ligación fueron efectuadas a una temperatura de 4°C por 16 horas, para luego ser utilizadas en los ensayos de transformación de células competentes.

b) Clonación por ligación mediante Topoisomerización

Este procedimiento se realizó a partir de productos de PCR que presentaron una baja concentración (< 2 ng / µL) con el fin de incrementar la eficiencia de clonación. El principio de este método se basó en la actividad catalítica de la Topoisomerasa I del virus *Vaccinia* la cual se une a sitios específicos del ADN de doble cadena (después de la secuencia 5'-CCCTT de una de las hebras) generando un rompimiento de los enlaces fosfodiéster (Shuman, 1991). La energía de rompimiento de esta hebra es mantenida por la formación de un enlace covalente entre el fosfato 3' de la hebra rota y un residuo tirosil

(Tyr-274) de la Topoisomerasa I. Este enlace denominado fosfo-tirosil entre el ADN y la enzima puede ser subsecuentemente atacado por un residuo 5' hidroxil de la hebra de ADN original, autoligándose y liberando la topoisomerasa (Shuman, 1994). Esta ligación se llevó a cabo entre hebras de ADN heterólogas, en este caso el inserto y el plásmido.

La reacción de ligación se procedió mezclando en un tubo 1.5 mL de 4µL de producto de PCR purificado, 1µL de solución de sal (1.2 M NaCl, 0.06 M MgCl₂) y 1µL (10 ng) de plásmido pTOPO el cual estaba suspendido en una solución conteniendo 50% glicerol, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1% Triton X-100, 100 µg/mL BSA, Topoisomerasa I y rojo de fenol. La mezcla fue incubada durante 5 minutos a temperatura ambiente y luego utilizada para la transformación de bacterias competentes.

4.5.9. Preparación de células competentes para quimiotransformación

Con el fin de realizar el proceso de transformación bacteriana, se seleccionaron las cepas de *E coli* XL1-BLUE (para el plásmido pGEM-T) y One Shot® TOP10 (plásmido pTOPO). Debido a que las células One Shot® TOP10 venían comercialmente listas para la transformación, el proceso de preparación se realizó únicamente en la línea celular XL1-Blue mediante el método de Cloruro de Calcio (Sambrook *et al.* 1989). Durante los procedimientos realizados para este fin se aseguró una completa esterilidad. Asimismo, los materiales y equipos empleados en la preparación de las bacterias fueron previamente enfriados a 4°C antes de su utilización.

Para el crecimiento de las bacterias, se realizó un preinóculo en 3 mL de caldo LB a partir de un tubo criopreservado de la cepa bacteriana XL1-BLUE. El tubo fue mantenido en movimiento constante en un agitador orbital automático de baño maría (LAB-LINE) a 37°C por 16 horas. Transcurrido dicho tiempo, todo el volumen de caldo LB del tubo fue añadido directamente a un matraz conteniendo 50 mL de caldo LB. El matraz fue mantenido en movimiento constante en un girador orbital

automático (Hoefer Pharmacia Biotech.) dentro de una incubadora digital de baja temperatura modelo 815 (Precisión Científico) a 37°C.

Después de 3 horas de incubación, se tomó una alícuota de cultivo para la lectura de la absorbancia a 600 nm con el fin de determinar un crecimiento óptimo no mayor de 10^8 células/ mL (0.5 - 0.7 unidades de O.D) (Sambrook *et al.* 1989). Posteriormente, las bacterias fueron refrigeradas a 4°C por 10 minutos y luego cosechadas en un tubo Falcon de 50 mL por centrifugación a 3520 rpm por 10 minutos a 4°C. Las bacterias precipitadas fueron resuspendidas en 15 mL de una solución conteniendo 15% de glicerol, 50 mM de CaCl_2 y agua de 18 Megahoms estéril. Luego de resuspender completamente el precipitado bacterial, la suspensión fue sometida a una centrifugación de 3500 rpm por 9 minutos a 4°C. El sobrenadante fue eliminado y las bacterias fueron nuevamente resuspendidas en 1.4 mL de la solución restante.

Por último, se repartió la suspensión bacteriana en alícuotas de 200 μL en tubos estériles de microcentrifugación e inmediatamente fueron almacenadas a - 70°C para realizar posteriormente la transformación de las células.

4.5.10. Transformación de células competentes

Para la transformación de células a partir de reacción de ligación con el vector pGEMT-easy, se tomó un volumen de 8 μL el cual se mezcló con un volumen de 100 μL de bacterias competentes. Para este procedimiento se consideraron controles sin inserto y con plásmido autoligado pUC18 (control de eficiencia de transformación).

Durante el proceso de transformación de las bacterias, la reacción de ligación se mezcló homogéneamente con el volumen de bacterias parcialmente descongeladas. Luego, la mezcla fue colocada en hielo seco por espacio de 30 minutos e inmediatamente sometida a baño maría a 42 °C por 90 segundos de duración con el fin de promover la apertura de poros en la pared bacteriana y facilitar el ingreso de los plásmidos.

Posteriormente, las bacterias fueron colocadas en hielo seco y resuspendidas con 1000 μL de caldo SOC, para luego ser sometidas a una incubación por 1 hora a 37 °C en movimiento constante. Cumplida

la hora de incubación, las bacterias fueron cosechadas a 12000 rpm por 30 segundos y el *pellet* fue resuspendido en 50 µL de caldo LB. Adicionalmente se añadió a la suspensión bacteriana 40 mM de IPTG y 7 mg/ml de X-gal. La mezcla fue suavemente homogeneizada y repartida en placas de LB agar suplementadas con 50 ug/ml de ampicilina. Las placas fueron incubadas por toda la noche a 37 °C.

En el caso de la transformación con el vector pTOPO, se tomó un volumen de 2µL de reacción de ligación y se mezcló suavemente con 50 µL de bacterias competentes. La mezcla se incubó en hielo por 30 minutos y luego se indujo a choque térmico a 42°C por 30 segundos. Las bacterias fueron resuspendidas en SOC pre-calentado a 37°C e incubado en placas LB agar ampicilina (50µg/mL) por 12 horas a 37°C.

Para todos los casos, las colonias fueron cuantificadas con luz blanca usando la opción *colony counting* del programa Quantity one incluido en el equipo Chemidoc XRS.

4.5.11. Preparación de ADN a pequeña escala

Para confirmar la presencia de plásmidos recombinantes, se realizó la selección de colonias blancas y la posterior extracción de ADN plasmídico según el procedimiento utilizado por Sambrook *et al.* (1989) el cual combina los métodos reportados por Ish-Horowicz & Burke (1981) con el método alcalino de Birnboim & Doly (1979). En un proceso inicial, las colonias fueron colocadas en tubos conteniendo 3 mL de caldo LB ampicilina a una concentración de 50 ug/ml. Los tubos fueron mantenidos en movimiento constante a 37 °C en baño maría por espacio de 16 horas (por toda la noche). Transcurrido dicho tiempo las bacterias fueron sedimentadas a 11500 rpm por 5 minutos sobre tubos de 1.5 mL estériles. Luego, el *pellet* fue resuspendido en 100 µL de Solución I (25 mM de Tris pH 8.0 y 10 mM EDTA) tras una vigorosa homogeneización. Seguidamente, se añadió 150 µL de la Solución II preparada al momento (1% SDS y 0.2 N de NaOH) y la suspensión fue suavemente homogeneizada por inversión. Luego de una incubación de 10 minutos en reposo a temperatura ambiente, se añadieron 150 µL de la Solución III a la suspensión (3 M de acetato de potasio pH 4.8 y 11.5 % de ácido

acético glacial). La suspensión fue homogeneizada suavemente e incubada en reposo a 4 °C por espacio de 10 minutos para luego ser sometida a una centrifugación de 12000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue cuidadosamente transferido a tubos nuevos de 1.5 mL conteniendo etanol absoluto a una proporción 2:1. La suspensión fue mantenida en reposo a 4 °C por un lapso de 20 minutos y posteriormente fue precipitado a 10000 rpm por 14 minutos. El pellet, fue subsecuentemente lavado con etanol al 70%, secado en estufa a 45 °C por 15 minutos y resuspendido en 50 µL de agua estéril libre de nucleasas. Se tomaron alícuotas de 5 µL de las minipreparaciones para ser visualizadas por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, tal como fue descrito previamente.

4.5.12. Secuenciamiento de producto de PCR

Para la determinación de la secuencia de los genes *gag*, *env* y *pol* se utilizó el equipo analizador genético 3100 Avant y el kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing. Para tal fin se añadió 10 ng de ADN en una mezcla de 20 µL de reacción conteniendo 4 µL de Big Dye, 1X de *Buffer* de secuenciamiento BigDye y 0.25 pmol de *primers*. Para el secuenciamiento de la región *gag* se utilizaron los *primers*: H1Gag1584 y g17, para el gen *env* los *primers* ED31 y ED33, para el gen *prt* PT-3 y PT-2, para *tr* Ne-1 y B, y para *pol* MAW-46, DSPR, PSR2, RT-a, RT-y, RT-b y HXB2-89.

La reacción de secuenciamiento fue sometida a 96°C por 1 minuto, 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos y 60°C por 4 minutos. Seguidamente los productos se mezclaron con una solución de precipitación fría conteniendo 3M de acetato de sodio pH= 5.4 y 78% de etanol. La mezcla fue incubada entre 20°C y 25 ° C por 20 minutos y luego centrifugada a 2000 g por 30 minutos. Después de un proceso de lavado con 70% de alcohol, la mezcla fue centrifugada a 2000 g por 15 minutos y los productos se secaron entre 20°C y 25°C por 20 minutos. Seguidamente los productos de secuenciamiento fueron denaturados con

15 µL de formamida pura y 95°C por 2 minutos. Finalizada la denaturación se colocó la placa en el analizador genético 3100 Avant.

4.5.13. Programas de análisis de ADN

a) Identificación de calidad de las secuencias mediante el programa Sequencing analysis v5.4

Los archivos generados con extensión AB1 por el programa ABI PRISM® BigDye® v3 Chemistries (WinNT) del analizador genético 3100 Avant fueron exportados al programa *Sequencing analysis v5.4* para el análisis de la calidad de las secuencias. Las secuencias que mostraron una alta calidad de lectura a través de la presencia de barras azules fueron seleccionadas para su posterior análisis por el programa *SeqScape v2.7*. Por el contrario, las secuencias que presentaron > 80% de barras rojas o amarillas fueron descartadas para su análisis y/o nuevamente secuenciadas usando los mismos *primers* o en su defecto *primers* alternativos descritos previamente para la región *pol*.

b) Construcción de secuencias consenso a través del programa SeqScape v2.7

Las secuencias originadas por los *primers* forward o reverse de cada gen analizado fueron ensambladas usando el programa *SeqScape v2.7*, el cual permitió realizar la comparación de secuencias superpuestas (*overlapping*) de cada gen. Una vez corregida y corroborada la presencia de ambigüedades y mutaciones en cada posición de la región analizada, el programa permitió la exportación de la secuencia consenso en formato FASTA. A partir de este formato, se realizaron todos los siguientes análisis de secuencia usando los programas de bioinformática descritos a continuación.

c) Análisis de la Diversidad Genética

La diversidad genética fue analizada entre los genes *gag*, *pol* y *env*, así como también entre los grupos TS y NTS. Para ello, se recurrió al cálculo del número de sitios segregantes, la diversidad de nucleótidos P_i (π), la tasa de cambios sinónimos (dS) sobre no sinónimos (dN), la tasa de

números de transversiones sobre transiciones y finalmente el estadístico D de Tajima (1989) usando el programa MEGA versión 7.0.14. El número de sitios segregantes se calculó determinando el total de posiciones que mostraron diferencias o polimorfismos dentro del alineamiento de secuencias de nucleótidos (Fu, 1995). La diversidad de nucleótidos (π) se obtuvo calculando el número promedio de diferencias por sitio entre secuencias tomadas a pares.

El número de cambios sinónimos (dS) se obtuvo determinando el total de cambios que no originaron variación de aminoácidos, mientras que el número de cambios no sinónimos (dN) se determinó obteniendo el total de cambios de nucleótidos que si generaron el cambio de un aminoácido por otro (Nei & Gojobori, 1986).

Para este tipo de análisis, las secuencias fueron alineadas mediante el programa ClustalX versión 2.1 (Thompson *et al.* 1994). El resultado de alineación fue emparejado de acuerdo al tamaño mínimo de las secuencias y finalmente almacenado en archivos con extensión *aln*. Seguidamente, estos archivos fueron convertidos a formato *meg* para su análisis en el programa MEGA. Los datos fueron importados considerando los tres marcos de lectura y eliminando los vacíos o *gaps* que se presentaron en el alineamiento final.

Seguidamente se determinó la tasa del número de Transiciones entre el total de Transversiones. Para ello se recurrió al método estadístico de Maximum Likelihood considerando el modelo Kimura 2-parámetros (Kimura 1980) y eliminando los vacíos o *gaps* que se presentaron en el alineamiento final. El programa determinó el número de transiciones tomando el total de sustituciones de una base purina por otra base purina ($A \leftrightarrow G$), o bien el número total de una base pirimidínica por otra base pirimidínica ($C \leftrightarrow T$). De igual forma, calculó el total de transversiones, sumando el total de sustituciones de una purina por una pirimidina o

viceversa. Los valores obtenidos de cada uno de ellos fueron divididos para obtener el índice estimado (Kimura, 1980).

El estadístico D del test de Tajima fue calculado a través de la diferencia de dos parámetros de diversidad genética: 1) El número promedio de diferencias entre pares de secuencias y 2) El número total de sitios segregantes. Para este cálculo, el test consideró a ambos valores como iguales dentro de una población de tamaño constante que evoluciona neutralmente (Tajima, 1989).

d) Identificación de los subtipos de VIH-1 por filogenia

Para la identificación de los subtipos genéticos se realizó el análisis filogenético usando el programa MEGA versión 7.0.14 (Kumar *et al.*, 1994). Para el diseño del árbol filogenético, las secuencias con extensión *aln* fueron convertidas a formato MEGA y luego importadas para su análisis respectivo. Se evaluaron diferentes réplicas de *bootstrap* de 250, 500 y 1000 reiteraciones y se analizaron por los métodos de Neighbor Joining (NJ) (Saito & Nei, 1987), Máxima Parsimonia (MP) (Fitch, 1971) y Máxima Verosimilitud (MV) (Thorne *et al.*, 1991). Para realizar este análisis, se recurrió a una base de datos de secuencias de referencia de VIH previamente genotipadas, obtenidas de la Base de Datos de Los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/mainpage.html>).

Asimismo, se determinó el modelo de substitución nucleotídica a través del programa FindModel del servidor HIV DataBase de los Alamos (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/findmodel/findmodel.html>). Este programa está basado en el método de ModelTest desarrollado por Posada y Crandall (1998), y realiza un cálculo de matriz de distancia para decidir el mejor modelo evolutivo (a partir de una lista de 28 modelos de substitución) que se ajustan a las características de las secuencias genéticas a estudiar.

Finalmente, se realizó la concatenación de secuencias usando los marcadores genéticos *gag*, *pol* y *env*. Para tal fin se realizó el alineamiento de las secuencias considerando el emparejamiento del

tamaño, nombre y marco de lectura de cada marcador genético con el propósito de mantener las secuencias en fase de lectura de aminoácidos. La corrección de las secuencias y la concatenación se llevó a cabo usando el programa BioEdit versión 7.2.5 (Hall, 1999), mientras que la determinación del marco de lectura se realizó con el programa *Translate tool* del servidor Expasy (<http://web.expasy.org/translate/>). Una vez realizada la concatenación de secuencias se procedió con la construcción del árbol filogenético usando el programa MEGA versión 7.0.14.

e) Análisis de recombinación

El análisis de recombinación se llevó a cabo mediante la utilización de los programas Retroviruses Genotyping Tool del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>), RDP (Recombination Detection Program *version* 4.61 (<http://web.cbio.uct.ac.za/~darren/rdp.html>), RIP (Recombination Identification Program, disponible en <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/RIP/RIP.html>) y SCUEAL (http://www.datamonkey.org/dataupload_scueal.php).

El programa Retroviruses Genotyping Tool, está incluido dentro del servidor del NCBI, el cual permite identificar el genotipo viral comparando la secuencia problema con una base de datos de VIH usando el método de BLAST (Altschul *et al.*, 1990), por lo que requiere menor tiempo para el análisis.

En el caso del programa RDP, fue desarrollado por Martin *et al.* (2005) y permite identificar y analizar eventos de recombinación y re-arreglo genético en un set de secuencias alineadas. Para ello combina diferentes programas de análisis como RDP, Geneconv, Chimaera, Maxchi, Bootscan, Siscan los que en su conjunto permiten el rápido análisis de sitios específicos de recombinación de manera simultánea mediante análisis filogenético de sitios *overlapping*.

Tanto para la simulación *in silico* como para el análisis de secuencias de las muestras de VIH, la secuencia FASTA de cada una fue analizada por

separado con cada grupo de secuencias de VIH de referencia para cada gen (*gag*, *pol* y *env*). A diferencia del programa Genotyping tool, el análisis de recombinación de este programa estuvo limitado al número de secuencias de referencia de cada subtipo de VIH con el que se haría la comparación de la muestra problema para la búsqueda de regiones de recombinación. Para ello, se generaron archivos con extensión *aln* de cada una de las muestras alineadas con los subtipos de referencia. Cada archivo fue analizado uno por uno para el análisis de recombinación con RDP.

Para el análisis de formas recombinantes de VIH a nivel de la región *pol* se utilizó el programa SCUEAL (por sus siglas en inglés *Subtype Classification Using Evolutionary ALgorithms*) (Kosakovsky *et al.*, 2009). Este software permitió identificar tanto subtipos genéticos como eventos de recombinación de tipo intra e inter-subtipo. Para la identificación de recombinación, el programa realizó un análisis filogenético usando el método de máxima verosimilitud (Maximum Likelihood o ML) de la secuencia problema utilizando diferentes regiones de la misma, y comparando secuencias de referencia de diferentes subtipos. La significancia de los resultados fue establecida mediante el promedio de los datos de análisis filogenético y mapeando los *breakpoints* calculados usando un algoritmo genético.

f) Análisis de hipermutación

Para la identificación de eventos de hipermutación en los genes virales analizados se utilizó el programa *Hypermut 2.0* del servidor HIV Los Alamos DataBase

(<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HYPERMUT/hypermut.html>), el cual permite identificar hipermutaciones en el genoma de VIH por acción de los sistemas de defensa humano APOBEC3G o APOBEC3F. Este programa utiliza una secuencia control hipermutada de referencia y una secuencia no hipermutada ya incluidas en su base de datos, las cuales son comparadas con la secuencia a ser evaluada. Para determinar si el fenómeno de hipermutación ocurrió utiliza el Test exacto

de Fisher el cual otorga un valor de significancia (valor p) al determinar un incremento significativo de mutación de la secuencia analizada respecto al control. Para realizar este análisis, se realizó previamente un control de calidad de las secuencias mediante el programa QC (HIV-1 Sequence Quality Analysis, (ver: <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/QC/index.html>) el cual permitió depurar errores intrínsecos de secuencias que ocurren *in vitro* o durante el ensamblaje de la secuencia consenso.

g) Análisis de tropismo de VIH

Para la identificación del tropismo de VIH (R5 y X4) se realizó la amplificación por triplicado del gen *env* y posteriormente los productos fueron secuenciados. Las secuencias obtenidas fueron ingresadas al programa Recall para su control de calidad externo, el cual evaluó la calidad de los electroferogramas y envió un reporte de las secuencias consideradas para ser reportadas. Seguidamente, se utilizaron los programas Recall (<http://pssm.cfenet.ubc.ca/>) y Geno2pheno 2.5 (<http://coreceptor.bioinf.mpi-inf.mpg.de/index.php>), los cuales en su conjunto permitieron identificar el tropismo celular de los virus basada en la secuencia genética del loop V3 de la secuencia del gen *env*. Para tal fin, se utilizaron los criterios de selección de las Recomendaciones del Grupo de Consenso Europeo sobre Manejo Clínico de los Ensayos de Tropismo de VIH-1. De acuerdo con ello, el sistema realizó una predicción de las secuencias basado en el valor más bajo de FPR (por sus siglas en inglés False Positive Rate), donde las secuencias con FPR con un score < 10% corresponden a X4, mientras que con FPR > 10% son R5.

h) Identificación de mutaciones de resistencia

Para el análisis de las mutaciones de resistencia se utilizó el servidor HIV Drug Resistance Database de la Universidad de Stanford (<http://hivdb.stanford.edu/>), para lo cual se usó el programa HIV db Program (<https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-sequences/>). Este programa utiliza secuencias en formato FASTA y analiza más de 100 secuencias al mismo tiempo. Asimismo, la base de datos de este

programa permite la identificación de hasta 104 mutaciones directamente relacionadas a la resistencia para más de 17 antirretrovirales diferentes.

4.5.1.4. *Análisis estadístico epidemiológico*

A partir de la información obtenida de los participantes, se creó una base de datos epidemiológica en la cual se consignó la edad, sexo, ejercicio del trabajo sexual, contacto con extranjeros, consumo de drogas recreativas, tratamiento antirretroviral y análisis de CD4/CD8.

El análisis estadístico se llevó a cabo usando el programa SPSS IBM versión 21. Para ello, los datos fueron almacenados en el programa Excel para el cálculo de frecuencias y porcentajes. Asimismo, se consideró el cálculo de Riesgo Absoluto (OR) y análisis de relación de variables cualitativas nominales a través del cálculo del Chi cuadrado (X^2) usando para ambos casos tablas de doble entrada.

Para el caso del cálculo de OR se recurrió a la siguiente fórmula (Kirkwood & Sterne, 2003):

$$\text{Odds Ratio} = \frac{ad}{bc}$$

Donde:

Exposición	Enfermedad	
	Presente	Ausente
Presente	a	b
Ausente	c	d
Total	a+c	b+d

Para el caso de este índice, la presencia de riesgo o beneficio dependerá del valor OR hallado entre un determinado intervalo de acuerdo a lo siguiente OR: 0 - 0.3: beneficio grande, 0.4 - 0.5: beneficio moderado, 0.6 – 0.8: beneficio leve, 0.9 – 1.1: sin efecto, 1.2 – 1.6: riesgo leve, 1.7 – 2.5: riesgo moderado y > 2.6: riesgo elevado (Kirkwood & Sterne, 2003).

Asimismo, se construyó una tabla de doble entrada para el cálculo de X^2 (Kirkwood & Sterne, 2003) considerando variables cualitativas obtenidas de los eventos de evolución molecular y contrastando con los factores de riesgo de los TS y NTS. Para el contraste de la hipótesis y el valor del índice p se consideró un intervalo de confianza de 95%.

Todos los reactivos usados en los procedimientos moleculares fueron obtenidos de diferentes compañías tales como Sigma, Merck, Promega y Biorad. Los reactivos, en la mayoría de los casos, fueron de grado biología molecular. Todas las soluciones fueron preparadas utilizando agua tridestilada de 15 Megohms excepto en las reacciones que exigían un grado mayor de pureza en el cual fue necesario recurrir al agua comercial de 18 Megohms (Sigma). Las enzimas empleadas en este estudio correspondieron a Applied Biosystem, Invitrogene y Amersham-Pharmacia. Las características de cada una de ellas son mencionadas durante la descripción de los experimentos realizados.

Todos los equipos empleados en el presente trabajo pertenecen al Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular del Instituto Nacional de Salud. Cada equipo recibe mantenimiento preventivo y calibración periódica a través del soporte técnico de las empresas fabricantes. Los equipos utilizados serán descritos durante la descripción de los experimentos realizados.

5. RESULTADOS

5.1. El ensayo de PCR para la amplificación de marcadores genéticos reveló diferencias de sensibilidad entre ellos

Según lo descrito en métodos, se procedió a la amplificación de cada uno de los marcadores moleculares propuestos. Los datos de PCR para el gen *gag* revelaron un producto de aproximadamente 460 pb, para el gen *env* de 550 pb, los genes *prt* y *tr* de 377 y 339 pb respectivamente, y finalmente para la región *pol* de 1200 pb (Figura 2).

A partir de las 93 muestras procesadas se obtuvo diferentes niveles de sensibilidad en la PCR, la cual dependió del tipo de fragmento amplificado. La mayor sensibilidad se obtuvo con el gen *env* del cual se lograron amplificar 77 muestras (82.8%), mientras que la región *pol* presentó el menor valor de sensibilidad con 50 muestras amplificadas (53.7%). En la Tabla 3 se muestra un resumen de los resultados de sensibilidad de la prueba de PCR para cada marcador genético.

De acuerdo a los resultados de análisis de calidad del ADN, se logró amplificar el gen de la β -globina en el 98% de las muestras analizadas ($n = 91/93$). Las muestras no amplificadas volvieron a ser extraídas con el kit Qiaamp viral de Qiagen y alternativamente con otras metodologías de extracción basadas en columna, obteniéndose resultados satisfactorios de amplificación.

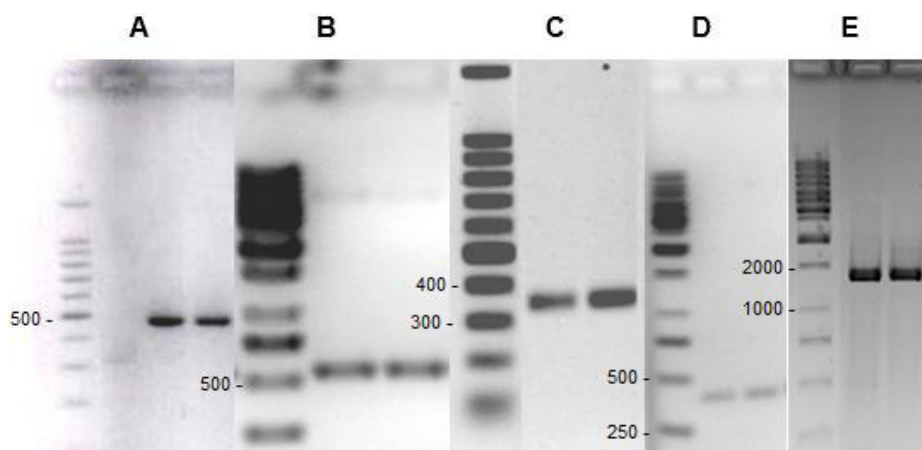


Figura 2. Amplificación de productos de PCR correspondiente al gen *gag* (A), gen *env* (B), gen *prt* (C), *tr* (D) y *pol* (E) del VIH-1 en muestras de sujetos infectados. Marcador de tamaño molecular 100 pb Ladder para geles A y C; Marcador de tamaño molecular 1Kb Ladder para geles B y D; Marcador Step Ladder para gel E.

Tabla 3

Porcentaje de sensibilidad del PCR de acuerdo a los marcadores *gag*, *env*, *prt* y *tr* analizados a partir de la población estudiada (n = 93)

	<i>gag</i>	<i>env</i>	<i>prt</i>	<i>tr</i>	<i>Pol</i>
Tamaño del fragmento (pb)	460	550	400	350	1200
Total productos amplificados (n / %)	69 (74.1)	77 (82.80)	57 (61.29)	76 (81.72)	50 (53.76)

Nota. En negrita se indica el valor más alto de sensibilidad de los *primers*.

5.2. Análisis de la diversidad genética de VIH a través de los diferentes marcadores seleccionados y por grupo de riesgo

Las secuencias genéticas obtenidas a partir de los productos de PCR purificados permitieron la caracterización de los genes *gag*, *pol* y *env* los cuales fueron analizados para determinar la diversidad intragénica, intergénica, y de manera concatenada (unión *gag-pol-env*), así como también entre los grupos de riesgo TS y NTS (n = 93) incluidos en este estudio.

Para ello se recurrió al Test de D de Tajima (1989), el cual permite identificar la diversidad genética a nivel de nucleótidos (P_i), el número de tasa entre los cambios no sinónimos y sinónimos (dN/dS), el número de tasa entre el total de transversiones y transiciones, y finalmente el estadístico D de Tajima, el cual permite conocer si la muestra en cuestión se encuentra en equilibrio neutral de evolución de acuerdo al signo positivo o negativo de su valor.

De acuerdo a los datos de la Tabla 4 obtenidos entre todos los genes analizados, el gen *pol* presentó el mayor número de sitios segregantes con 304 sitios, sin embargo como era de esperar, el número de sitios segregantes aumentó a 544 después de concantenar todos los genes.

Con relación a la diversidad genética (P_i), el gen *env* presentó el mayor índice con 0.09 mientras que el gen *pol* presentó el menor valor con 0.04.

Asimismo, el gen *env* presentó el mayor número de tasa entre cambios no sinónimos (dN) y sinónimos (dS) con 0.66, sin embargo mostró el menor número de tasa entre transiciones y transversiones con un valor de 2. Con relación al estadístico D de Tajima, todos los genes presentaron valores negativos, siendo el gen *gag* el que presentó el mayor valor negativo con -0.76.

Tabla 4
Análisis de la diversidad genética entre los genes *gag*, *pol* y *env* de VIH mediante el Test D de Tajima

Gen	S	π	dN / dS	Trans / Transv	D
<i>gag</i>	84	0.078802	0.567568	2.39	-0.756522
<i>env</i>	116	0.093655	0.662857	2.04	-1.001257
<i>pol</i>	304	0.040897	0.406417	3.07	-1.785443
<i>gag-pol-env</i>	544	0.071077	0.452579	3.04	-1.053716

Nota: S = número total de sitios segregantes, π = Diversidad a nivel de nucleótidos, dN / dS = tasa entre cambios no sinónimos (dN) y sinónimos (dS), Trans/Transv = Tasa entre transversiones y transiciones, D = estadístico del test D de Tajima (Tajima, 1989).

Al evaluar estos mismos parámetros entre los grupos de riesgo TS y NTS se observó que el mayor número de sitios segregantes a nivel de *gag* ocurrió en el grupo NTS con 96, mientras que el grupo TS presentó los mayores valores tanto a nivel del gen *pol* como de *env*. Al concatenar los genes, el mayor número de sitios segregantes se identificó en el grupo NTS, sin embargo al juntar los grupos TS y NTS el número de sitios segregantes se elevó a 544 (Tabla 5).

Con respecto a la diversidad a nivel de nucleótidos (π), el grupo TS presentó el mayor valor con 0.10 a nivel del gen *env* y *gag*, sin embargo a nivel de *pol* la diversidad fue mayor para el grupo NTS con 0.05.

Al analizar la tasa de cambios dN/dS, se observó que en todos los genes individuales y a partir de genes concatenados, el grupo de TS presentó

mayor valor que NTS. Sin embargo, cuando se analizó la tasa de Trans/Transv se observó que fue mayor en el grupo de NTS.

Finalmente, se demostró que en todos los casos el estadístico D de Tajima fue siempre negativo, aunque el mayor valor fue encontrado en el grupo de NTS a nivel de genes concatenados con -0.76.

Tabla 5
Análisis de la diversidad genética entre los grupos TS y NTS mediante el Test de D de Tajima

Grupo	gen	S	π	dN / dS	Trans / Transv	D
TS	<i>gag</i>	73	0.072586	0.467949	3.33	-0.996205
	<i>pol</i>	216	0.030911	0.280156	3.24	-1.894882
	<i>env</i>	107	0.102564	0.59116	1.96	-0.961057
	<i>gag-pol-env</i>	461	0.071007	0.346096	3.3	-0.998799
NTS	<i>gag</i>	96	0.061362	0.341637	3.15	-1.305247
	<i>pol</i>	198	0.057039	0.214984	4.51	-1.244343
	<i>env</i>	74	0.074629	0.440476	2.68	-1.217324
	<i>gag-pol-env</i>	337	0.063489	0.255497	2.77	-0.767124
TS + NTS	<i>gag</i>	68	0.057844	0.456376	2.79	-1.107401
	<i>pol</i>	243	0.029742	0.321854	3.21	-2.066046
	<i>env</i>	86	0.081422	0.646617	2.22	-1.207482
	<i>gag-pol-env</i>	480	0.062152	0.382775	2'88	-1.053716

Nota.- S = número total de sitios segregantes, π = Diversidad a nivel de nucleótidos, dN / dS = tasa entre cambios no sinónimos (dN) y sinónimos (dS), Trans/Transv = Tasa entre transversiones y transiciones, D = estadístico del test D de Tajima (1989), *gag-pol-env* = genes concatenados. TS = Trabajador(a) sexual. NTS = No trabajador(a) sexual.

5.3. Selección del método de análisis filogenético mediante análisis de subtipos de referencia de VIH

Se realizó una búsqueda y selección de secuencias de referencia de VIH previamente subtipificadas en la Base de Datos de VIH de Los Alamos (Ver <http://www.hiv.lanl.gov/content/index>), con el fin de ser analizadas con los métodos Neighbor Joining (NJ), Máxima Parsimonia (MP) y Maxima Verosimilitud (ML por sus siglas en inglés) y de esta manera validar el poder de resolución de cada método.

Previamente a este análisis, se realizó el cálculo del modelo de sustitución nucleotídica utilizando el programa FindModel (Ver sección Materiales y Métodos) para cada uno de los marcadores genéticos. De acuerdo a los datos encontrados, el modelo de sustitución seleccionado por el programa para los tres genes fue el de Jukes Cantor (J-C) (Jukes & Cantor, 1969).

Seguidamente se realizó el análisis filogenético utilizando J-C y *bootstraps* de 250, 500 y 1000 de repeticiones para cada método filogenético. De acuerdo a los resultados obtenidos, se observó que los tres métodos presentaron topologías similares con excepción de ML el cual permitió definir con mayor precisión los clados de los subtipos de VIH de referencia para los tres marcadores genéticos (Tabla 6). Asimismo, al comparar la topología de los árboles filogenéticos usando los tres marcadores moleculares para la clasificación de los subtipos, se observó que el gen *gag* presentó menor especificidad para definir los clados filogenéticos en comparación con *pol* y *env*, presentando un error en la clasificación de unas de las cepas correspondiente al subtipo A (Tabla 6).

Estos datos en conjunto muestran que el mejor método a utilizar para la clasificación de los subtipos de VIH es ML utilizando los marcadores *env* y *pol*. Asimismo se demuestra que durante la evaluación de los clados para la clasificación de los subtipos no se encontró mayor variación al utilizar el método de *bootstrap* con 250 y 1000 repeticiones. En consecuencia, se seleccionó ML para la identificación de los subtipos de VIH utilizando 500 repeticiones de *bootstrap* analizando los marcadores *gag*, *pol* y *env*.

5.4. Análisis filogenético de subtipos de VIH a partir de muestras clínicas demuestra que el subtipo predominante fue el B

Se realizó el análisis filogenético considerando cada uno de los marcadores genéticos y el método filogenético seleccionado. Los árboles filogenéticos obtenidos se muestran en las figuras 3A, 3B, 3C y 3D. De acuerdo a los hallazgos, todas las muestras analizadas para cada gen en particular formaron un sólo clado filogenético con secuencias de VIH de referencia correspondientes al subtipo B (resaltadas en marco rojo); mientras que las

secuencias de referencia de otros subtipos de VIH se asociaron en un grupo filogenético aparte denominado “otros subtipos”.

Asimismo se observó que entre las variantes genéticas de TS y NTS no hubo diferencias significativas ya que muchas de ellas se asociaron entre sí y de manera aleatoria, con valores *bootstrap* < 60% (Hillis & Bull, 1993).

Con el fin de robustecer el análisis filogenético para la identificación del subtipo se realizó la concatenación de secuencias tal como fue descrito previamente en Metodología. De acuerdo a los resultados se logró la concatenación de 50 secuencias *gag-pol-env* de 1428 pb, entre los cuales se incluyeron los subtipos de referencia. A través del análisis filogenético permitió determinar nuevamente que el subtipo genético en las muestras analizadas fue el B con un valor *bootstrap* de 76% (Figura 3D).

Tabla 6. Validación de métodos de análisis filogenético para la identificación de subtipos de VIH de referencia

Número de réplicas de bootstrap utilizado	Método filogenético analizado para identificación de subtipos					
	Neighbor Joining		Máxima parsimonia		Máxima verosimilitud	
	Porcentaje (%) de variantes de VIH agrupadas correctamente (intervalo de valor bootstrap en %)	% de clados incorrectos (valor bootstrap en %)	Porcentaje (%) de variantes de VIH agrupadas correctamente (intervalo de valor bootstrap en %)	% de clados incorrectos (valor bootstrap en %)	Porcentaje (%) de variantes de VIH agrupadas correctamente (intervalo de valor bootstrap en %)	% de clados incorrectos (valor bootstrap en %)
250	97 (74-100)	3 (44)	91 (22-100)	9 (0-29)	100 (26-100)	0
500	97 (79 - 100)	3 (41)	91 (26-100)	9 (0-35)	100 (29-100)	0
1000	97 (79 - 100)	3 (40)	91 (23-100)	9 (0-33)	100 (24-100)	0
250	100 (81 - 100)	0	100 (96-100)	0	100 (100)	0
500	100 (99 - 100)	0	100 (98-100)	0	100 (100)	0
1000	100 (99 - 100)	0	100 (98-100)	0	100 (99-100)	0
250	100 (99 - 100)	0	100 (92-100)	0	100 (96-100)	0
500	100 (99 - 100)	0	100 (91-100)	0	100 (95-100)	0
1000	100 (100)	0	100 (89-100)	0	100 (94-100)	0

Nota.- En negrita se muestra el porcentaje de clados filogenéticos agrupados incorrectamente.

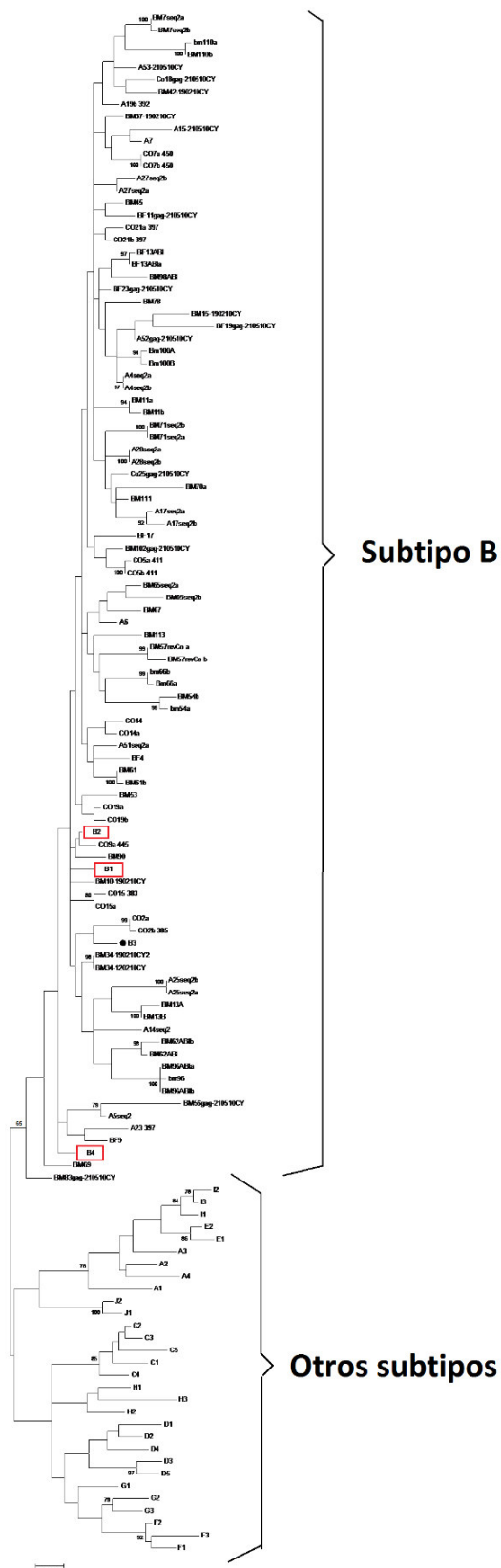


Figura 3A. Análisis filogenético de muestras de VIH-1 a través del método de Máxima Verosimilitud con un *bootstrap* de 500 réplicas mediante análisis del gen *gag* a partir de muestras de VIH de pacientes estudiados. El clado “otros subtipos” corresponde a los subtipos de referencia de la A hasta la H. Las cepas de referencia de subtipo B se señalan en los recuadros rojos. Sólo se muestran los valores *bootstrap* > 60%.

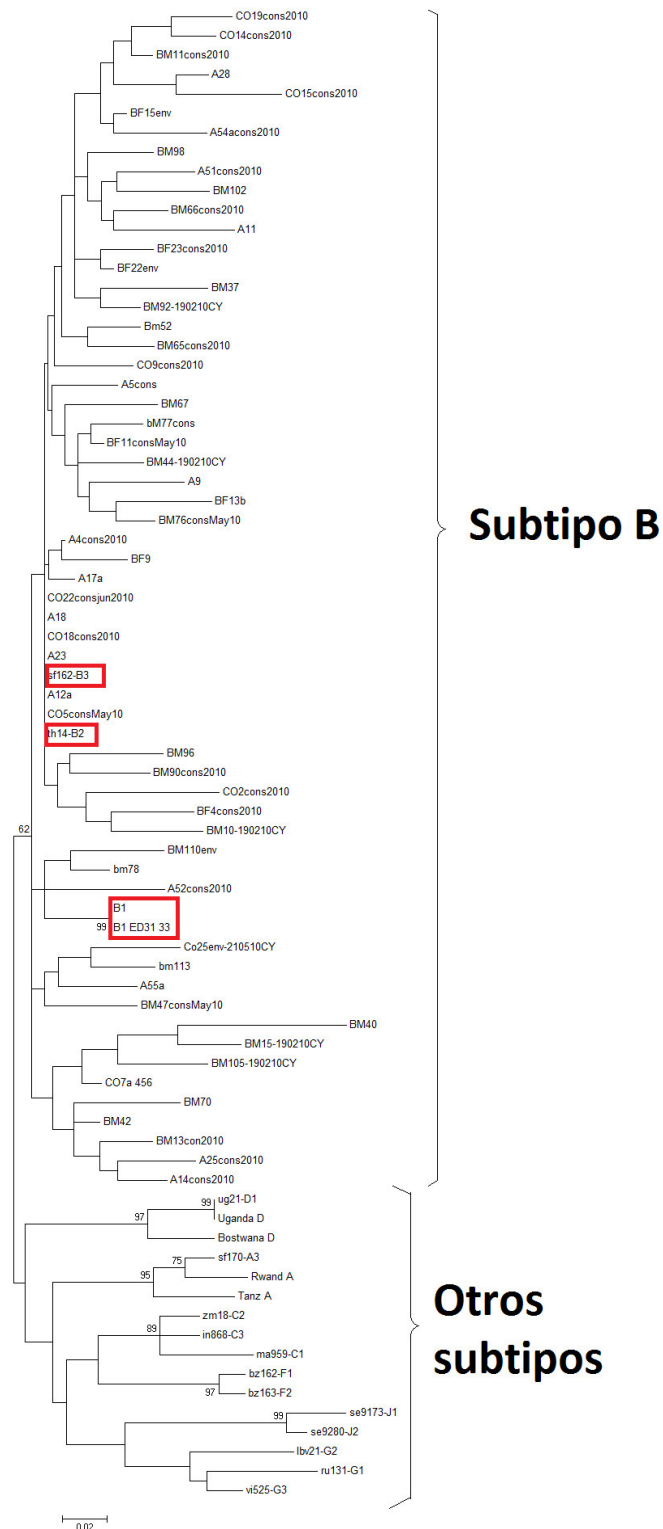


Figura 3B. Análisis filogenético de muestras de VIH-1 a través del método de Máxima Verosimilitud con un *bootstrap* de 500 réplicas mediante análisis del gen *env* a partir de muestras de VIH de pacientes estudiados. El clado “otros subtipos” corresponde a los subtipos de referencia de la A hasta la H. Las cepas de referencia de subtipo B se señalan en los recuadros rojos.

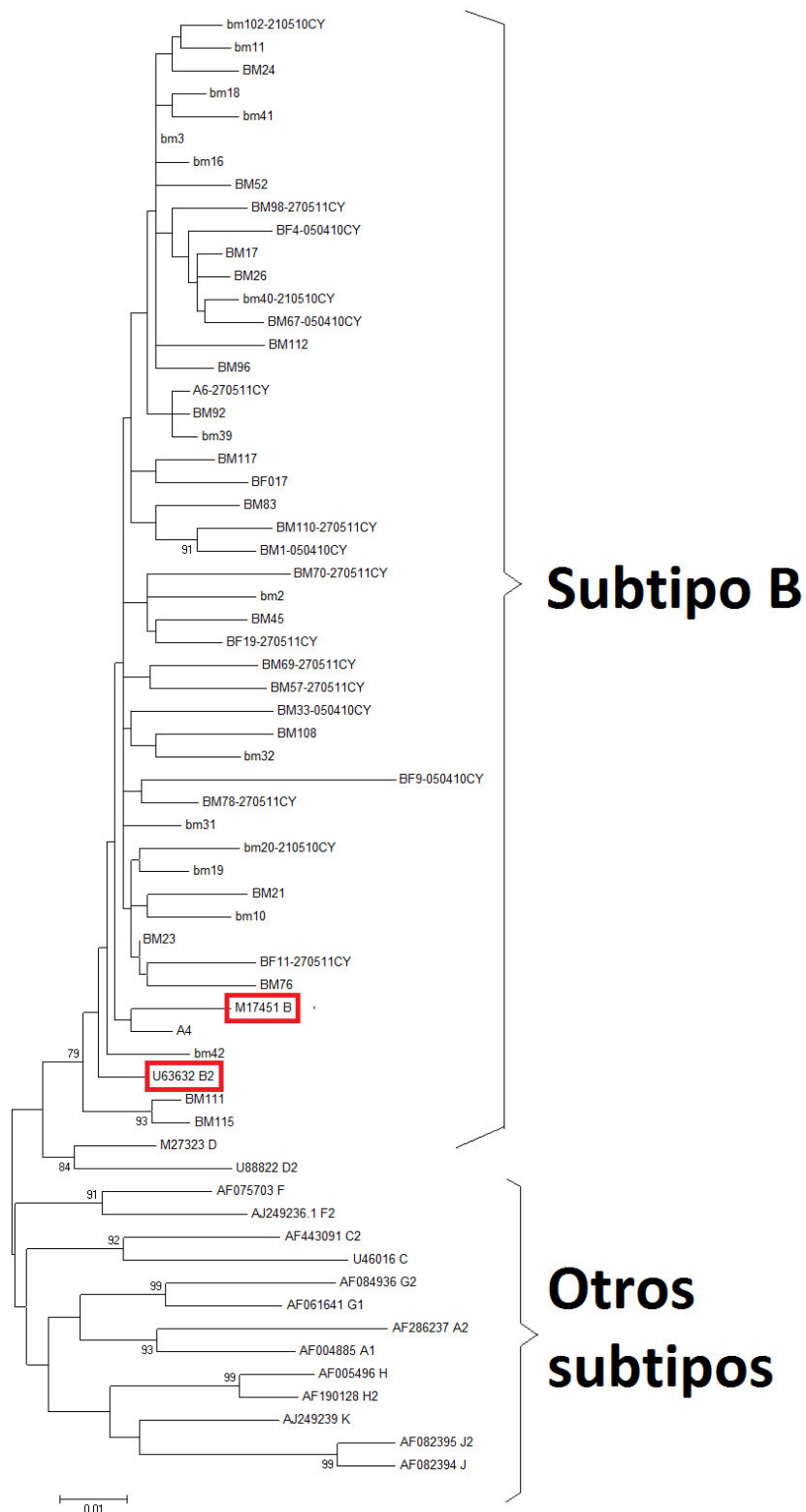


Figura 3C. Análisis filogenético de muestras de VIH-1 a través del método de Máxima Verosimilitud con un *bootstrap* de 500 réplicas mediante análisis del gen *pol* a partir de muestras de VIH de pacientes estudiados. El clado “otros subtipos” corresponde a los subtipos de referencia de la A hasta la H. Las cepas de referencia de subtipo B se señalan en los recuadros rojos.

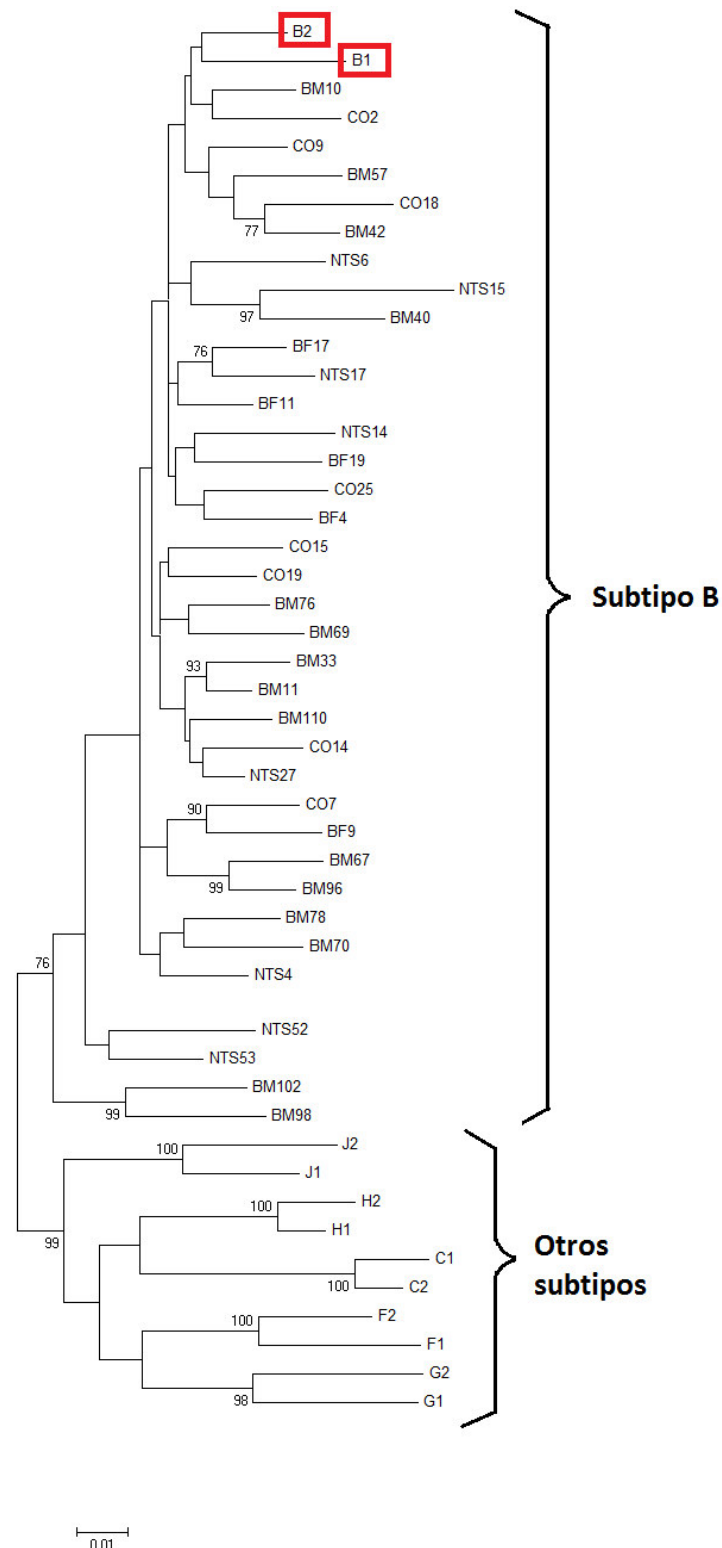


Figura 3D: Análisis filogenético de muestras de VIH-1 a través del método de Máxima Verosimilitud con un *bootstrap* de 500 réplicas mediante análisis de concatenación de los genes *gag-pol-env* a partir de muestras de VIH de pacientes estudiados. El clado “otros subtipos” corresponde a otros subtipos de referencia diferentes de B. Las cepas de referencia de subtipo B se señalan en los recuadros rojos.

5.5. Análisis de recombinación de los genes *gag*, *pol* y *env* de VIH en TS y NTS

5.5.1. Diseño de simulación *in silico* de recombinación intra-subtipo e inter-subtipo

Para validar el método apropiado de recombinación se realizó una simulación de formas recombinantes intra e inter-subtipo utilizando secuencias de referencia de VIH. Para ello se seleccionaron secuencias correspondientes a la región de interés (*gag*, *env* y *pol*) considerando el tamaño del amplicón obtenido *in vitro* (Ver métodos). Seguidamente, se construyeron secuencias quiméricas de recombinación combinando dos secuencias de referencia de subtipos diferentes representativos (Ejem: B y J) para cada uno de los genes y en diferente grado de combinación, con el fin de evaluar la sensibilidad de cada método en identificar las formas recombinantes (Tabla 7).

En general se observó que el programa RDP permitió la identificación de un mayor número de formas recombinantes a través del análisis del gen *env* (5/6, 83%). Sin embargo todos los programas presentaron la misma sensibilidad para la identificación de recombinación inter-subtipo a través del gen *pol* (3/3, 100%). Asimismo, se observó que solo los programas RIP y RDP fueron capaces de identificar recombinación intra-subtipo mediante el análisis del gen *env*, aunque en bajo porcentaje (2/3, 66.7%). En tanto, ningún programa fue lo suficientemente sensible para identificar recombinación a través del análisis del gen *gag*, donde solo se detectó recombinación inter-subtipo con una sensibilidad de 66.7%.

En conclusión, el análisis de recombinación a través de las formas recombinantes quiméricas mostró que existe una mayor probabilidad de identificar recombinación de tipo inter-subtipo a través del análisis de los genes *env* y *pol* utilizando los programas Genotyping tool y RDP. De manera alternativa, el programa Squeal también brindó una alta sensibilidad, aunque estuvo limitado al análisis del gen *pol*. Con relación a las formas recombinantes intra-subtipo, el programa RDP fue el único que permitió identificar al menos en los genes *env* y *pol*. En ese sentido,

para el análisis de recombinación de las muestras de VIH se excluyó RIP por ser menos sensible que los demás programas, Squeal por no incluir los demás marcadores y Genotyping tool por no identificar formas recombinantes intra-subtipo.

5.5.2. Análisis de recombinación en muestras de VIH

El análisis de recombinación a partir de las muestras de VIH en TS y NTS reveló un porcentaje que varió de acuerdo al tipo de gen analizado. En general se observó que los eventos de recombinación a través de RDP variaron entre 6 y 14%. Asimismo, se observó que el marcador genético que presentó menor recombinación fue *pol* (6%), mientras que *env* presentó la mayor frecuencia en las muestras analizadas (14%).

Dentro de los diferentes tipos de recombinación, se observó que la forma B/D fue la más frecuente (4/7 para *gag* y 4/11 para *pol*) mientras que otras formas menos frecuentes se encontraron entre B y los subtipos A, AE, C, F y G. Por último, se encontraron tres casos de recombinación intra-subtipo los cuales solo ocurrieron en el gen *env* (Tabla 8).

Asimismo, se realizó el cálculo del porcentaje de recombinantes por grupo de riesgo, observándose una mayor frecuencia de recombinación en la población de NTS con un índice de 28% (9/22), mientras que en TS se observó un porcentaje de 21% (Tabla 9).

Tabla 7. Análisis de simulación de recombinación intra e intergenética en los genes gag, env y pol utilizando secuencias de referencia de VIH-1													
Simulación de recombinación	Representación gráfica de la recombinación simulada*			Detección de recombinación según programa seleccionado									
				Genotyping tool			RIP			RDP			
	env	gag	pol	env	gag	pol	env	gag	pol	env	gag	pol	Scueal (pol) solo pol
Intersubtipo B / J	B			SI	SI	SI	NO	SI	SI	SI	NO	SI	SI
	J			SI	SI	SI	NO	NO	SI	SI	SI	SI	SI
				SI	NO	SI	NO	SI	SI	SI	NO	SI	SI
Simulación intrasubtipo B1 / B2	B1			NO	NO	NO	NO	NO	NO	SI	NO	SI	NO
	B2			NO	NO	NO	SI	NO	NO	NO	NO	NO	NO
				NO	NO	NO	SI	NO	NO	SI	NO	NO	NO
Sensibilidad del programa de recombinación: n casos / total (%)	Intra / Intersubtipo			3/6 (50)	2/6 (33.3)	3/6(50)	2/6 (33)	2/6 (33.3)	3/6 (50)	5/6 (83)	1/6 (16)	4/6 (66.7)	3/6 (50)
	Intersubtipo			3/3 (100)	2/3 (66.7)	3/3(100)	0/3 (50)	2/3 (66.7)	3/3 (100)	3/3 (100)	1/3 (33.3)	3/3 (100)	3/3 (100)
	Intrasubtipo			0/3 (0)	0/3 (0)	0/3 (0)	2/3 (66.7)	0/3 (0)	0/3 (0)	2/3 (66.7)	0/3 (0)	1/3 (33.3)	0/3 (0)

Nota.- Los colores indican la secuencia de cada subtipo, los cuales fueron cortados y ensamblados manualmente.

Tabla 8
Eventos de recombinación en VIH-1 de acuerdo al tipo de gen analizado

Gen (número de secuencias)	n (%)	Tipo de recombinación (número)
<i>gag</i> (n = 69)	7 (10)	B/D2 (4), B/G5 (1), B/AE (1), B/D3 (1)
<i>env</i> (n = 77)	11 (14)	B/D (4), B/B2 (3), B/F1 (3), B/C1 (1), B/A3, B/G (1)
<i>pol</i> (n = 50)	3 (6)	B/D (1), B/K (1), B/F (1)

Nota: las letras en mayúscula separadas por un slash (/) representan los subtipos de VIH-1 recombinados unos con otros.

Tabla 9
Eventos de recombinación en VIH-1 de acuerdo al tipo de población de riesgo analizada

	TS		NTS		TS+NTS	
	n	%	n	%	n	%
Recombinantes	13	21.3	9	28.1	22	23.7
No recombinantes	48	78.7	23	71.9	71	76.3
Total	61	100.0	32	100.0	93	100.0

Nota: TS = Trabajador (a) sexual. NTS = No trabajador (a) sexual.

5.6. *El análisis de HMA reveló la presencia de poblaciones mixtas intra-subtipo de VIH*

Los datos de simulación de infección mixta intra-subtipo e inter-subtipo de ADN proveniente de plásmidos de referencia usando el método HMA, revelaron patrones que fueron diferentes entre sí. Tal como se muestra en la Figura 4A, la simulación de eventos de infección inter-subtipo mostraron bandas heterodúplex localizadas por encima de las bandas de cadena simple. Mientras que en la Figura 4B, correspondiente a la simulación de infección intra-subtipo se observó la localización de las bandas entre las bandas homodúplex de cadena simple y cadena doble.

Al aplicar el mismo principio del procedimiento en las muestras clínicas (Figura 5), se observaron dieciocho casos (Doce en TS y seis en NTS) que presentaron un patrón de heterodúplex similar a la simulación de infección intra-subtipo (HMA de VIH de referencia del mismo subtipo, Figura 4B) sugiriendo la presencia de infecciones mixtas del mismo subtipo en la población analizada.

5.7. *El análisis de clonación reveló la presencia de infección mixta intra-subtipo de dos linajes diferentes en una muestra clínica de paciente infectado*

Del total de casos con patrones similares a eventos de infecciones mixtas, se seleccionó aleatoriamente una muestra de VIH (BM61), con el fin de analizar la relación filogenética de las variantes genéticas virales en dicha muestra.

Para ello se analizó una librería de plásmidos recombinantes portando el gen *env* correspondiente a la muestra código BM61 seleccionada aleatoriamente. Esta librería fue obtenida mediante procedimientos de clonación molecular (Ver sección: Materiales y Métodos). De acuerdo a los resultados, se lograron identificar 33 clones para la muestra de código BM61, los cuales fueron confirmadas por PCR mediante la visualización del inserto (Figura 6B).

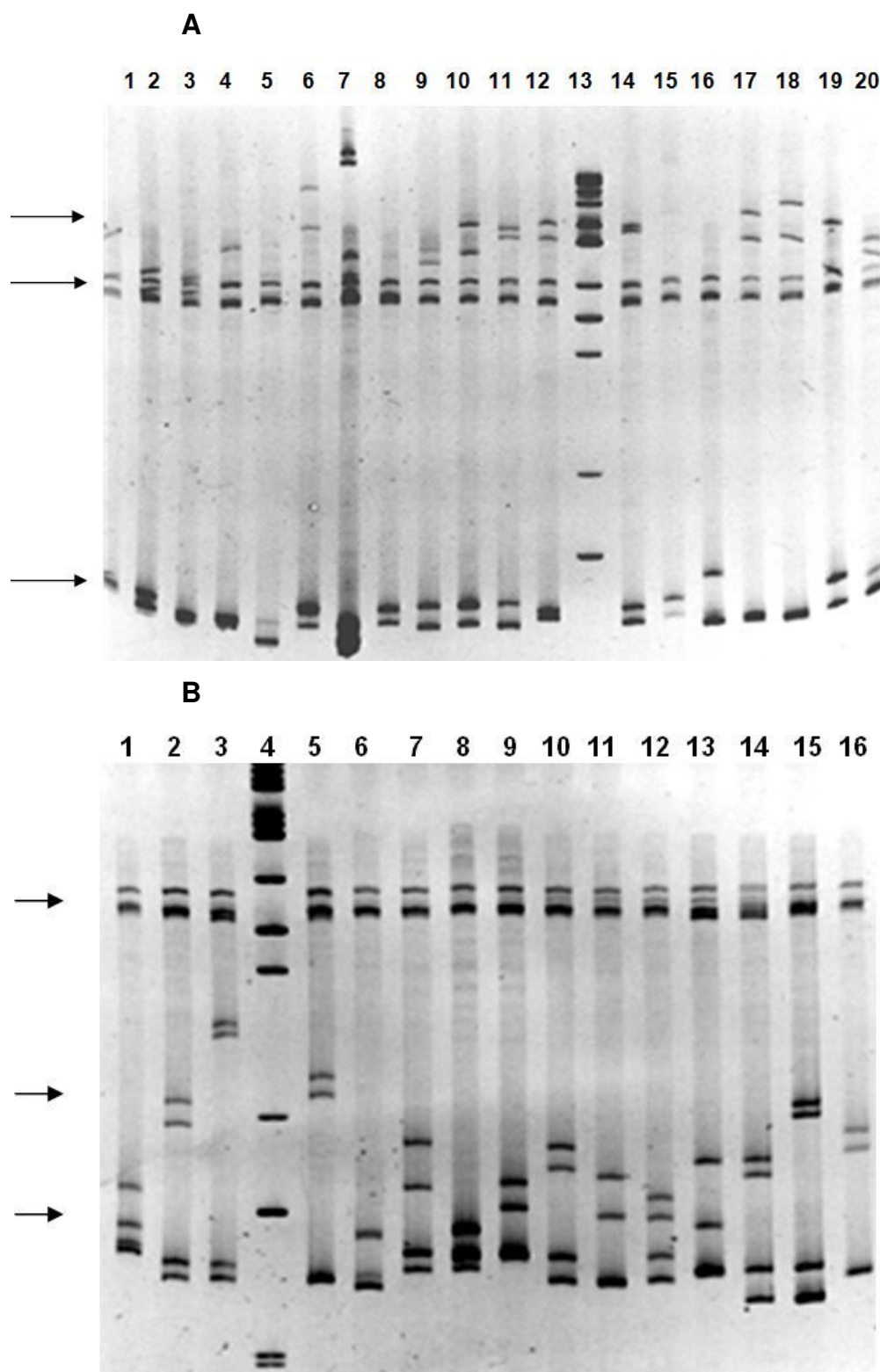


Figura 4. Simulación de infección inter-subtipo (A) e intra-subtipo (B) mediante HMA utilizando el gen *env* de VIH-1 a partir de los subtipos de referencia de VIH (Ver sección Materiales y Métodos). En A, la flecha superior indica los heterodúplex inter-subtipo formados al mezclar subtipos diferentes de VIH, la flecha intermedia los homodúplex de cadena simple y la flecha inferior los homodúplex de cadena doble. En B, la flecha superior indica los homodúplex de cadena simple, la flecha intermedia los heterodúplex intra-subtipo formados al mezclar cepas de origen diferente pero del mismo subtipo y la flecha inferior los homodúplex de cadena doble. Carril 13 (fig. A) y Carril 4 (fig B): Marcador de ADN estándar Step Ladder.

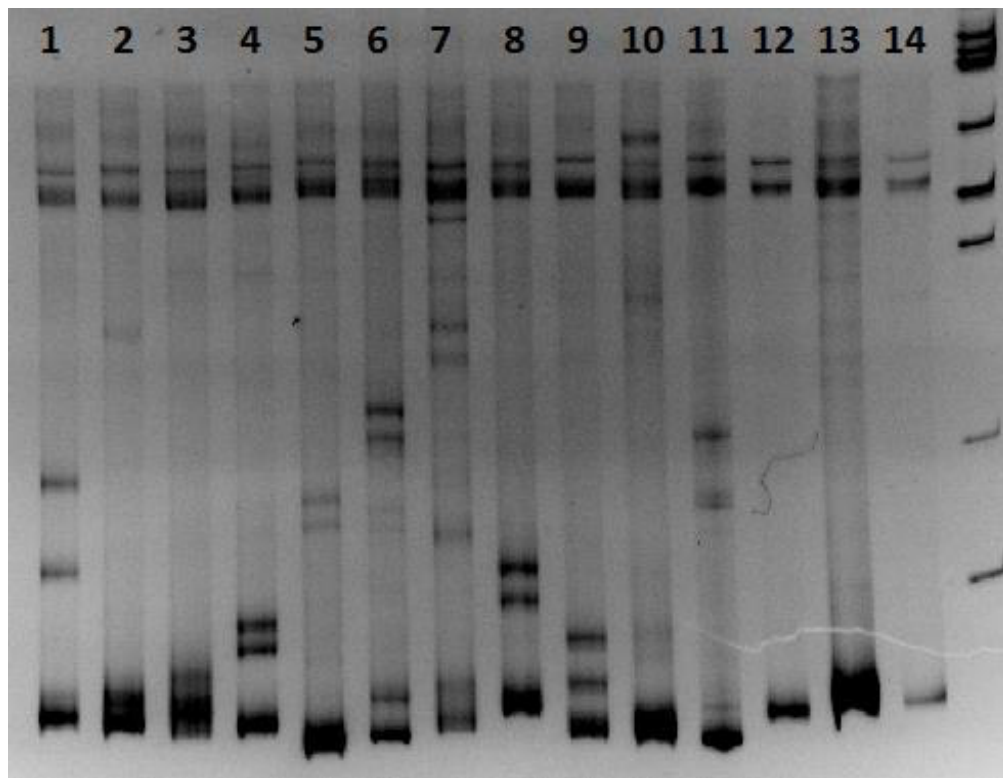


Figura 5. Análisis de HMA mediante el gen *env* de VIH-1 para la identificación de casos de infecciones mixtas a partir de un grupo de TS (carriles 1 al 8) y NTS (carriles del 9 al 14). Los heterodúplex que muestran la presencia de infecciones mixtas de variantes de VIH en un solo paciente se pueden apreciar en los carriles 1, 2, 4-11, mientras que las demás muestras (carriles 3, 12, 13 y 14) no mostraron estas conformaciones. El marcador de peso molecular de 1Kb ladder se muestra a la derecha del carril 14.

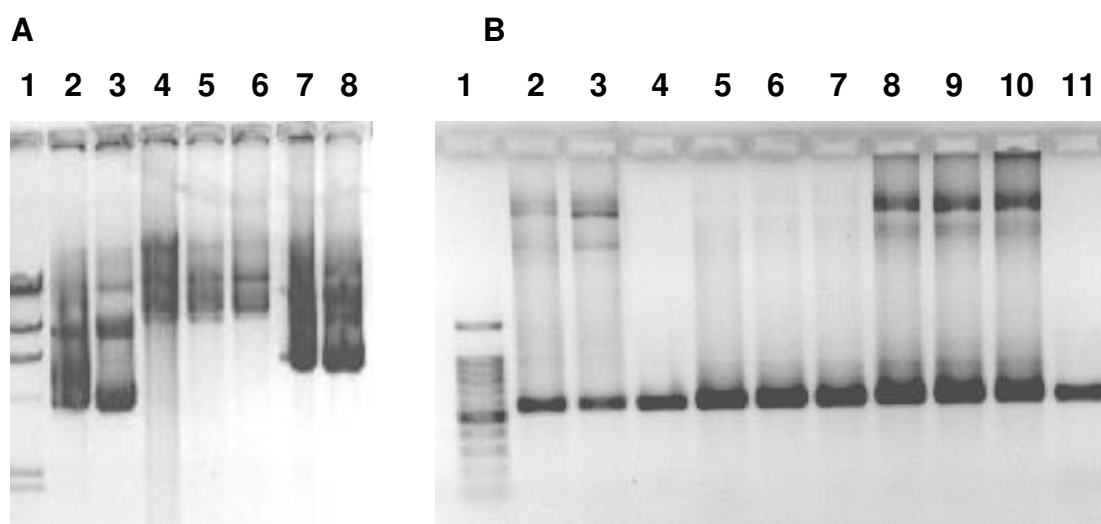


Figura 6. A. Análisis de miniprep a partir de la muestra BM61 de VIH-1 mostrando los plásmidos que portan el gen de interés *env* de VIH. Carril 1: Marcador Lambda HindIII, Carriles del 4 al 6, plásmidos recombinantes. Carriles 2, 3, 7 y 8: plásmidos sin inserto. B. Análisis de PCR a partir de plásmidos recombinantes mostrando el producto de amplificación del gen *env* para la confirmación de la clonación molecular: Carril 1: Marcador 100 pb ladder, Carriles del 2 al 11: producto de PCR de 550 pb del gen de interés clonado.

Cada clon recombinante en particular fue secuenciado para permitir el análisis filogenético entre las variantes genéticas virales de la muestra BM61. De acuerdo a los resultados, se observó la presencia de dos grupos monofiléticos diferentes (*bootstrap* > 75%), lo que evidenció la existencia de infección mixta de variantes genéticas de VIH subtipo B (infección intra-subtipo) (Figura 7).

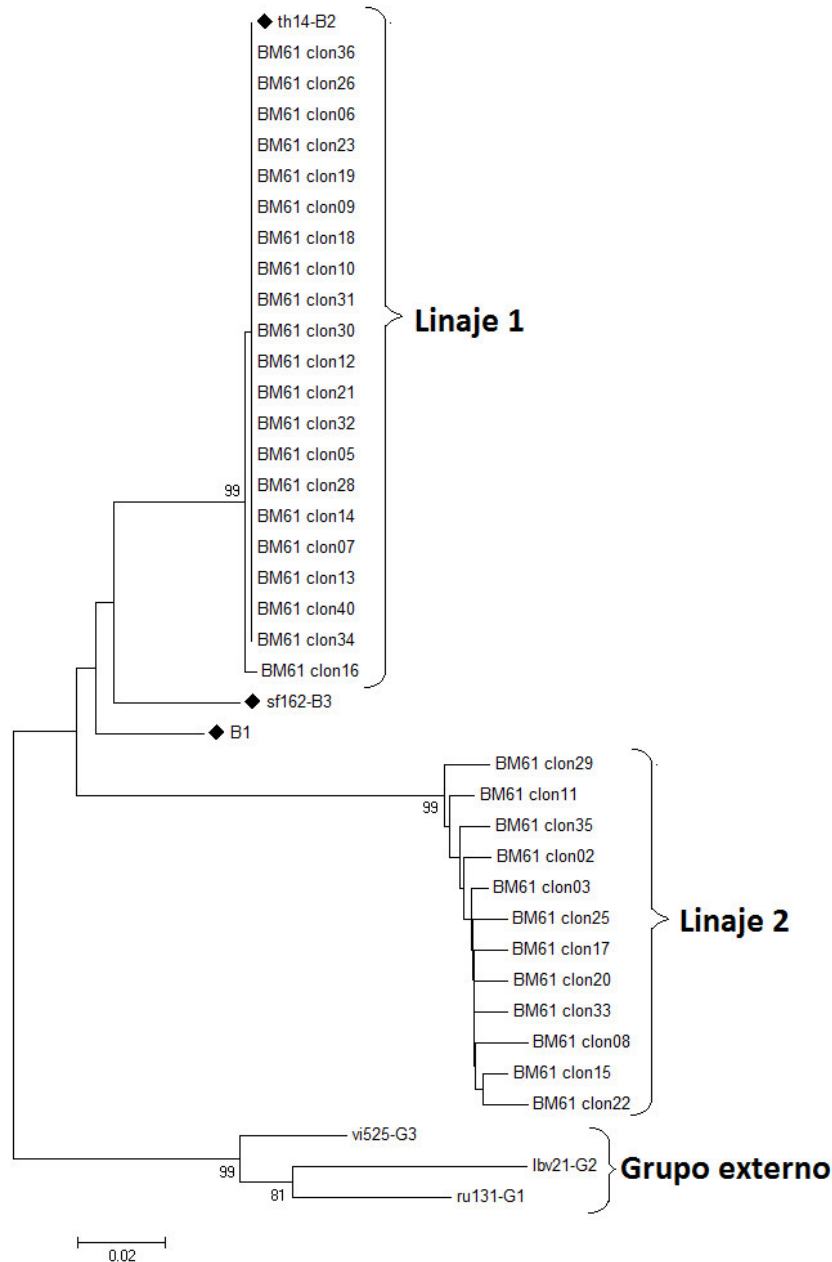


Figura 7. Análisis filogenético a través del método de Máxima Verosimilitud de variantes genéticas virales de la muestra BM61 de VIH-1 en el que se evidencia la presencia de 2 grupos filogenéticamente diferentes de subtipo B. El símbolo (♦) indica las secuencias de referencia de subtipo B utilizadas para la clasificación de la muestra. Los números en cada clado indican el valor *bootstrap*.

5.8. **Análisis de tropismo de VIH-1 reveló presencia de cepas virales R5 y X4**

Las secuencias del gen *env* fueron sometidas a los programas Recall y Geno2pheno para el análisis de tropismo tal como fue descrito en metodología. De acuerdo a los resultados se observó que en la población de estudio hubo en general una mayor frecuencia de cepas virales R5 (66%) sobre las X4 (31%) y dos cepas cuyo tropismo no fue identificado (3%) (Tabla 10).

Tabla 10
Caracterización del Tropismo de VIH a través del análisis de la región V3 del gen *env* en TS y NTS

	Código	Loop V3	Subtipo según loop V3	FPR	TROPISMO
1	BM1	CTRPNNNTRKSVHIGPGSAFYATGEIIG DIRQAYC	A o AG	48.60%	R5
2	BM6	CTPAGFAILKCRDKRFNGTGTCKNVST VQC	B	1.80%	X4
3	BM10	CMRPNNNTMKSIHIGPGSAFYATGQII GDIRQAHC	B	8.90%	X4
4	BM11	CTRPNNNTRRSIPIGPGRAFATGEIIG DIRRAYC	B	25.30%	R5
5	BM13	CTRPNNNTRKSIPIGPGSAIYATGQIIG NIRQAHC	B	47.80%	R5
6	BM15	CTKPNNNTRKSIHIEPGRAFYTTEIIE NIKQAHC	B	96.20%	R5
7	BM17	CTRPNNHTRRRMTLSPGRVFYTTGEIIG NIKKAHC	B	0.50%	X4
8	BM33	CTRPSNNSRRSINMAGGRVLFTTDIIG DIRQAHC	B	72.00%	R5
9	BM34	CTRPNNNTRRSINMAGGTVLFTTDIIG NIRQAHC	B	90.30%	R5
10	BM37	CTRPNNNTRKSIHMGPRVFFTEIIGN IREAHC	B	32.00%	R5
11	BM40	CIRSNNNTKKSIPIGPERAFYATENIIKD IKQAHC	B	100.00%	R5
12	BM42	CTRPNNNTR[KE]SI[TS]IGPGRAF[YF] ATGDIIGDIRQAHC	B	77.10%	R5

13	BM44	CTRPNNNTRRSVTFGPGKVWYTTGQV VGDIRRAYC	AE	2.80%	X4
14	BM47	CTRPYNNTKRRIHIGPGRAFIATGSIRG NIRKAHC	B	1.50%	X4
15	BM52	CTRPNNNTRKSIHIAPGRAFYATGDIIG DIRQAHC	B	83.00%	R5
16	BM54	CIRPNNNTGKSLPLGPGKVFYTTGDIIG DIRQAH	B	11.70%	R5
17	BM56	CIKPHNNTRKSVSVGPGRAWFATGDII KNIRQAHC	B	54.50%	R5
18	BM57	CTRP[NS]NNTRKSIH[IML]GPGRAWY [TA]TG[QHREDG]IIGDIRQAHC	B	12.00%	R5
19	BM61	CTRPNNNTRKSIHLGPGRAWYTTGQII GDIRQAHC	B	12.50%	R5
20	BM62	ND	ND	0.00%	ND
21	BM65	CTRPHKTTRKGIRIGPGEAFYTTGGITG DIGQAYC	B	3.80%	X4
22	BM66	CTRPNNNTRKSIISIGPGRAFYTTGDIIG DIRKAYC	B	13.00%	R5
23	BM67	CTRPNNNTRRSINIGPGRAFYATDIIGD IRQAHC	B	63.10%	R5
24	BM69	CMRPNNNTRRSIPMGPGKAFYATGEVI GNIRQAHC	B	13.00%	R5
25	BM70	CTRPNNNTRRSITVAPGKAIYATGDIIG NIRQAHC	B	23.60%	R5
26	BM76	CTRPNNNTRKSIH[IL]GPG[RS]AFYTT GQIIGDIRQAHC	B	22.40%	R5
27	BM77	CTRPNNNTRRSIPIGPGRAFYATGDIIG DIRKAYC	B	71.20%	R5
28	BM78	CTRPNNNTRRSIHVGPGKALYTTDIIGD IRQAYC	B	25.30%	R5
29	BM83	ND	ND	0.00%	ND
30	BM90	CIRPNNNTRRSIPIGPGGGVVRTGDIIG DIRQAHC	B	43.20%	R5
31	BM92	CTRPNNNTRKGIPMGPGKVFYTTDIIG DIRKAYC	B	14.10%	R5
32	BM96	CTRPNNNTRKGIIIGPGSAFYATGNIIG DIRQAHC	B	51.20%	R5
33	BM98	CTRPNNNTRKSIHIGPGRFYARGDIIG DIRKAYC	B	5.30%	X4
34	BM102	CTRPNNNTRKSIHIGPGRFYATGGIIG [KN][ILV]REAHC	B	47.80%	R5
35	BM105	CTRPNNNTRKSIHLGPGRFYATGNIIG NIRQAHC	B	50.50%	R5
36	BM110	CMRPNNNTRKGIHIGPG[KR]TFFTTGE IIGNIRQAHC	B	14.80%	R5

37	BM113	CTRPSNNTSRSIHMAVGRAFATERIT GDIRKAYC	B	3.80%	X4
38	BF4	CTRPNNNTRKSIHMGPGRAFYTGDII GEIRQAHC	B	45.70%	R5
39	BF9	CTRPNNNTRKSIHIGPGRAFYTGEIIG NIRHAYC	B	47.80%	R5
40	BF11	C[IMV]RPNNNTR[KR]SI[HP][IL]GPG RAFYATG[ED]IIG[ND]IRQAHC	B	41.30%	R5
41	BF13	CIRPNNNTRKSIHIGPGRTFYATGDVIG DIRQAHC	B	74.40%	R5
42	BF15	C[TISL]RPNN[NH]TRK[RS]VT[IL]GP GR[AV]FY[TA]TG[ED]I[IV]GDIRKAH C	B	1.70%	X4
43	BF17	CIRPNNNTRKSIHIGPGTTFYATGNVIG DIRQAHC	A o AG	91.70%	R5
44	BF19	CTRPNNITRKSIHMGVGRKFYATKRIG DIRQAHC	B	1.70%	X4
45	BF22	CTRPNNNTRKSIHIGPGKTFYTTGGIIG DIRKAYC	B	33.90%	R5
46	BF23	CTRPNNNTRKGIHLGPGKTFYATGEIIG DIRQAH[CF]	B	74.40%	R5
47	NTS4	[CF]TRPN[NH][QH*Y][TS]RKSIHLGP G[PR]AWYTTGQIIGDIRQAHC	B	5.30%	X4
48	NTS5	CMRPHNNTRKSV[YS]VGPGRAWFAT GDIIGDIRQAHC	B	2.80%	X4
49	NTS6	CTRPNNNTRKSIPMGPGKVFT	B	38.10%	X4
50	NTS7	CTRPNNNTRKSIHIGPGRAFFAGNDIIG NIRQ	B	85.80%	R5
51	NTS9	CTRPNNNTRKGVHMGPGKVYFTTDIIG DLRQAHC	B	7.80%	X4
52	NTS11	CTRPNNNTIKGIHIGPGRAFYASEQIIG DIRQAYC	B	7.80%	X4
53	NTS12	CTRPNNNTRKSIHLGPG[PR]AWYTTG QIIGDIRQAHC	B	17.10%	R5
54	NTS14	PTIIQGEVYLWDQGRAFYTGDIIIGD[I L]R[KR]AY[WC]	B	0.20%	X4
55	NTS15	CTRPNNKTRRSLSLGPGRAFVATRQIIG DIRKAHC	B	0.50%	X4
56	NTS17	CTRPNNNTGKSIHLGPGQAWYTTGQII GDIRQAHC	B	85.80%	R5
57	NTS18	CTRPNNNTRKSIHLGPGRAWYTTGQII GDIRQAHC	B	12.50%	R5
58	NTS19	CTRPNNNTRKSIHLGPG[RG]AWYTTG QIIGDIRQAHC	B	14.30%	R5
59	NTS23	CTRPNNNTRKSIHLGPGRAWYTTGQII GDIRQAHC	B	12.50%	R5

60	NTS25	CTRPSNNTRRSISFGPGRTFYTTGEIIG DIRQAHC	B	58.50%	R5
61	NTS27	CTRPNNNTRRSIHIAPGSFYTTGEIIG DIRQAHC	B	68.80%	R5
62	NTS28	CTRPNNNTRKGIHMGPGRTFYATGEII GDIRKAYC	B	41.40%	R5
63	NTS51	CTRPGNHKRRRIRIGHIGPGRFYTTG GTIGDIRQAHC	B	0.00%	X4
64	NTS52	CTRPNNNTR[KR][SG]IHMGPSTIYA TGEIIGNIRQAYC	B	41.30%	R5
65	NTS53	CTRPNNNTRKGIHGLGRALYTDDIVG DIRQAHC	B	21.20%	R5
66	NTS54	CTRPNNNTRKSINIGPGRFYATGDIIG DIGQAHC	B	96.20%	R5
67	NTS55	CTRPNNNTRKRVTMGPGKVWYTTGQII GDIRKAHC	B	0.70%	X4
68	CO2	[WC]TRPNNNIRK[DG]IHIGPRRRAF[Y F]AIKQITGIKQ[TA]HC	B	8.20%	X4
69	CO5	CTRPN[NT]N[TP]RKSI[HL]LGPGRAW YTTGQIIGDIRQA[HL]C	B	7.10%	X4
70	CO7	CTRPNNNTRKSINIGPGRFYATGDIIG DIRKAHC	B	54.70%	R5
71	CO9	CTRPNNNTIKSIRIGPGSAFFTTGQ[IV] IGDIRQA[HY]C	B	9.60%	X4
72	CO14	C[TS]RPNNNTRKSIHMGPGGAFY[AS] [TS]G[ED]IIGDIRKAYC	B	26.20%	R5
73	CO15	CTRPNNNTRKGIHIGPGRTFYATGEIIG DIRQAHC	B	72.10%	R5
74	CO18	CTRPNNNTRKSIHLGPGRAWYTTGQII GDIRQAHC	B	12.50%	R5
75	CO19	CTRPNNNTRKSISMGPGRAIYAAGRRII GDIRKAHC	B	1.70%	X4
76	CO22	CTRPNNNTRKSI[TP]IGPGRA[WCLF]Y [TA]TG[QHED]IIGDIRQAHC	B	36.70%	R5
77	CO25	CTRPSNNIRRSIYRGPGQAF[RC]ATGS ITGDIRKAYC	AE	1.90%	X4

Nota: Los códigos BM y BF corresponden al grupo de TS, mientras que CO corresponde al grupo de NTS. FPR = False Positive Rate, representa la probabilidad tipificar erróneamente un virus R5 como X4 (si los valores son < 10% el virus es considerado R5, ver metodología). R5 = Virus con Tropismo al receptor CCR5; X4 = Virus con Tropismo al receptor CXCR4. ND= No determinado. TS = Trabajador(a) sexual. NTS = No trabajador(a) sexual.

5.9. Cepas de VIH con tropismo X4 presentaron mayor capacidad replicativa y generaron una mayor disminución de las células CD4 en población de TS y NTS

Se realizó un análisis de tropismo a partir de las muestras de TS y NTS según su carga viral (CV) y recuento de CD4 para determinar el valor promedio del estatus virológico e inmunológico en los pacientes infectados con cepas R5 y X4.

De acuerdo al análisis se determinó un total de 17 cepas con información de CV, de las cuales se observó que en ambos grupos de TS y NTS, el valor de carga viral fue mayor en cepas X4 (>400,000 copias / mL) que en R5 (>255,000 copias / mL).

Con relación al CD4, se identificó que el valor fue menor (101 células/ μ L) en población NTS infectada con cepas X4 que en aquellos con R5 (158 células/ μ L). En general, se observó que en promedio el CD4 fue menor en la mayoría de pacientes que presentaron infección con cepas X4 (163 células/ μ L) que aquellos infectados con VIH tropismo R5 (180 células/ μ L) (Tabla 11).

5.10. Análisis de mutaciones en el dominio conservado MHR

Se hizo un análisis comparativo de secuencia de aminoácidos de *gag* para encontrar diferencias a nivel del dominio conservado de la Región de Mayor Homología (MHR) de Gagp24, una región genética conocida por presentar la menor variabilidad genética en el genoma de VIH (Mammano *et al.*, 1994). El análisis comparativo reveló la presencia de cambios conservados y no conservados entre los diferentes grupos analizados. Sin embargo, se observó que en la población de TS hubo un mayor número de cambios de aminoácidos no conservados ($n = 12$) en este dominio, a diferencia de la población de NTS donde hubo menos ($n = 5$).

Dentro de los cambios no conservados más frecuentes, se encontró la forma Treonina (T) \rightarrow Valina (V), el cual apareció tanto en TS como NTS (4 y 3 respectivamente). Sin embargo, en la población de TS, también se observaron otros ocho cambios no conservados pero sólo en un caso por muestra de VIH (Tabla 12).

Tabla 11

Análisis de CV y recuento de CD4 de acuerdo al tropismo de las muestras de VIH a partir de la población estudiada

	TS (n = 46)				NTS (n = 31)				Total (TS + NTS) (n = 77)			
	R5	X4	ND		R5	X4	ND		R5	X4	ND	
n (%)	34 (73.9)	10 (21.7)	2 (4.3)		17 (54.8)	14 (45.2)	0 (0.0)		51 (66.2)	24 (31.2)	2 (2.6)	
CV total (n = 17):												
Promedio (copias / mL)	213956.5	321917.0	0.0		297161.0	523275.0	0 (0.0)		255558.8	422596.0	0.0	
CD4 total (n = 55):												
Promedio (cel / uL)	201.3	224.4	0.0		157.8	101.0	0 (0.0)		179.6	162.7	0.0	

Nota.- En negrita se muestran los valores mayores por columna. TS = trabajador (a) sexual. NTS = No trabajador (a) sexual. CV = Carga viral. CD4 = Recuento de linfocitos T CD4. R5 = Virus con tropismo al receptor CCR5 de la célula hospedera. X4 = Virus con tropismo al receptor CXCR4 de la célula hospedera. TS = trabajador (a) sexual. NTS = No trabajador (a) sexual.

Tabla 12

Comparación de cambios de aminoácidos debido a mutaciones en el dominio MHR del gen *gag* de VIH-1 entre las poblaciones analizadas

Código	Grupo humano	Comparación de AAs	Substitución de aminoácidos															
			Conservados				No conservados											
			R-K	K-R	D-E	V-I	R-E	Q-R	E-K	R-G	G-R	R-S	P-S	T-V	Q-T			
HXB2	-	IRQGPKEPFRDYVDRFYKTL																
BM7	TS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
BM11	TS	.ER.....	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
BM13	TS	.T...KS.....G.....	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1			
BM15	TS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
BM33	TS	.K.....	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
BM45	TS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
BM53	TS	.K.....	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
BM54	TS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
BM61	TS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
BM62	TSE.....	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
BM65	TS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
BM66	TS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
BM67	TS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
BM69	TS	.K.....	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
BM70	TS	.K.....V..	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0		
BM71	TS	.K.R.....V..	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0			
BM76	TS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
BM78	TS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
BM90	TS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
BM96	TS	.K.....	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
BM98	TS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
BM100	TS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
BM102	TS	.K.....R..	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
BM111	TS	.K.....V..	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0		
BF9	TS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
BF11	TS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
BF13	TS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
BF15	TS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
BF19	TS	.K.....	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
BF22	TSV..	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0		
BF23	TS	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
Subtotal			9	0	1	0	1	1	1	1	1	0	2	4	1			
Total			10				12											
NTS4	NTS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
NTS5	NTSE.....	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
NTS6	NTS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
NTS7	NTS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
NTS14	NTS	.K.....S.....	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
NTS15	NTSI.....	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
NTS17	NTSV..	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0		
NTS19	NTS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
NTS23	NTS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
NTS25	NTS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
NTS27	NTS	.K.....	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
NTS28	NTS	.K.....V..	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0		
NTS51	NTS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
NTS53	NTS	.K.....S.....	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0		
CO2	NTS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CO5	NTSK.....	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CO7	NTS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CO9	NTS	.K.....	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CO14	NTS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CO15	NTS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CO18	NTS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CO19	NTS	.K.....	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CO21	NTS	.K.....	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CO25	NTS	.K.....V..	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0		
			9	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	3	0			
			11				5											

Nota.- En **negrita** se resaltan los cambios de aminoácidos no conservados del dominio MHR. La muestra HXB2 representa la secuencia de la cepa control de VIH proveído por el HIV Reagent Program de los EEUU. TS =Trabajador (a) sexual. NTS = No trabajador(a) sexual.

5.11. Evidencia de hipermutación en una muestra de TS

El análisis de cambios de tipo A→G y G→A en las regiones *env*, *gag* y *pol* para la identificación de hipermutación reveló la presencia de un caso a nivel de la región *pol* correspondiente a una muestra de TS. La secuencia se caracterizó por la presencia de 6 cambios inusuales a nivel de proteasa y 6 a nivel de transcriptasa reversa (Tabla 13). Se observaron mutaciones atípicas de tipo APOBEC 3G/F tanto en el gen de la proteasa (G17R, G48R, G51R, G78R, G86R, G94S) como en de la transcriptasa reversa (M16I, M41I, G45R, G51R, G141R, M230I). Asimismo se observaron cinco codones de detención a lo largo de la transcriptasa reversa localizados en las posiciones 88, 212, 229, 252, 266.

Debido a que la muestra presentó una carga viral de 512 (datos no mostrados) lo cual indica replicación viral activa, se procedió a realizar la genotipificación a partir de las partículas virales circulando en plasma para estudiar la hipermutación a este nivel. Los datos demostraron que no existió hipermutación a nivel de ARN.

Tabla 13
Cambios genéticos debido a la hipermutación de la región *pol* (proteasa y transcriptasa reversa) de la muestra código BF9 de VIH-1

Cambios relacionados a hipermutación	Gen afectado	
	Proteasa	Transcriptasa reversa
Codones de detención	Ninguno	88, 212, 229, 252, 266
Residuos inusuales	G17R, G48R, G51R, G78R, G86R, G94S	M16I, G45R, G51R, G141R, M230I, G273R
Hipermutación a nivel de AA	G17R, G48R, G51R, G78R, G86R, G94S	M16I, M41I, G45R, G51R, W88*, G141R, W212*, W229*, W252*, W266*
Tipo de Hipermutación	Apobec 3G/F	Apobec 3G/F

Nota: El asterisco (*) muestra las posiciones de aminoácidos donde ocurrió un codón de detención como consecuencia de la hipermutación. La mutación se denota como X_nY, donde X es el aminoácido original, *n* es la posición en la proteína, mientras que Y es el nuevo aminoácido cambiado, producto de la mutación.

En conjunto, estos datos revelan que la hipermutación identificada en el estudio solo ocurrió a nivel proviral. Con el fin de corroborar la veracidad de los resultados, se procedió a la repetición del análisis de la muestra desde extracción de ADN hasta secuenciamiento obteniéndose los mismos resultados. En la Tabla 14 se muestran las mutaciones que ocurrieron y el índice de Fisher que demuestra evidencia de hipermutación.

Tabla 14
Hipermutación de la muestra BF9 de VIH-1 mostrando los tipos de cambios genéticos ocurridos

Código	Radio G→A / A→G	Divergencia con HXB2: nt (%)	N° de substituciones		p (Fisher)
			G→A	A→G	
BF9	36/7	67 (3)	36	7	0.000122

Nota.- Las flechas indican los cambios de nucleótidos generados por la misma hipermutación. El test de Fisher es incluido dentro del algoritmo para validar la presencia de la hipermutación en la secuencia analizada cuyo valor debe aproximarse a cero. G = Guanina, A = Adenina.

5.12. El perfil de genotipo de VIH reveló un alto índice de resistencia primaria en TS

Se realizó la caracterización de las mutaciones de resistencia a los ARV a partir del análisis de los genes *prot* y *tr*. En total se caracterizaron cuatro mutaciones asociadas a la resistencia frente a inhibidores de proteasa (IP), diez asociadas a Inhibidores Nucleósidos de Transcriptasa Reversa (INTR) y nueve relacionadas con resistencia a Inhibidores No Nucleósidos de Transcriptasa Reversa (INNTR). Dentro de las mutaciones más frecuentes se tienen la D30N (2.2%) a nivel de IP y las mutaciones K219R y V219D (6.5%) en la transcriptasa reversa (Tabla 15).

Al hacer una comparación de la resistencia en toda la población estudiada se observó que el mayor índice de resistencia fue encontrado en la población con tratamiento ARV (34.6%). De manera interesante, se observaron casos de resistencia primaria o transmitida, es decir resistencia a los ARV en población virgen de tratamiento (*naïve*). Este índice fue mayor dentro del

grupo de TS (17%), el cual fue mayor frente a INTR (13%), mientras que en la población tratada fue frente a IP (Tabla 16).

Para saber la frecuencia de la resistencia de acuerdo al sexo, se hizo un análisis comparativo entre TS y NTS. Según la Tabla 17, se observó que el grupo de mujeres no tratadas con ARV (TS y NTS) presentó un mayor índice de resistencia (20%) que los hombres. Sin embargo, al agrupar la resistencia por grupo de riesgo, se determinó que la mayor frecuencia de resistencia fue de tipo primaria, y fue encontrada en la población TS de varones (11.5%).

Tabla 15
Lista de mutaciones asociadas a la resistencia molecular a los
antirretrovirales en VIH-1 de la población estudiada

% Mutaciones principales a IP		% Mutaciones frente a INTR		% Mutaciones frente a INNTR	
D30N	2.2	K219R	6.5	V179D	6.5
I54V	1.1	M184V	4.3	K103N	3.2
L90M	1.1	M41L	1.1	V90I	1.1
V32I	1.1	T69D	1.1	V106I	1.1
		T69N	1.1	V108I	1.1
		L74V	1.1	E138K	1.1
		M184I	1.1	V179E	1.1
		L210W	1.1	G190R	1.1
		T215Y	1.1	M230I	1.1
		T215F	1.1		

Nota.- IP = Inhibidores de Proteasa; INTR = Inhibidores Nucleósidos de Transcriptasa Reversa; INNTR = Inhibidores No Nucleósidos de Transcriptasa Reversa.

Tabla 16. Frecuencia de la resistencia a los antirretrovirales en VIH-1 de tipo adquirida (tratados) y transmitida (naive) en la población estudiada

	Total		IP		INTR		INNTR	
	n	%	n	%	n	%	n	%
TS + NTS (n = 81)	19.0	23.5	5.0	6.2	10.0	12.3	10.0	12.3
Naive (n = 53)	11.0	13.6	1.0	1.2	7.0	8.6	6.0	7.4
Tratados (n = 28)	8.0	9.9	4.0	4.9	3.0	3.7	4.0	4.9
Sólo TS (n = 53)	11.0	20.8	1.0	1.9	7.0	13.2	6.0	11.3
Naive (n = 37)	9.0	17.0	1.0	1.9	7.0	13.2	4.0	7.5
Tratados (n = 16)	2.0	3.8	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	3.8
Sólo NTS (n = 28)	8.0	28.6	4.0	14.3	3.0	10.7	4.0	14.3
Naive (n = 16)	2.0	7.1	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	7.1
Tratados (n = 12)	6.0	21.4	4.0	14.3	3.0	10.7	2.0	7.1

Nota.- Naive = Paciente que no ha recibido tratamiento. IP: Inhibidores de proteasa, INTR: Inhibidores Nucleósidos de Transcriptasa Reversa, INNTR: Inhibidores No Nucleósidos de Transcriptasa Reversa. n = número total. % = porcentaje. Los números en **negrita** indican máximos valores resaltados por columna y por fila. TS = Trabajador (a) sexual. NTS = No trabajador (a) sexual.

Tabla 17
Distribución de acuerdo al sexo de la resistencia a los antirretrovirales del VIH-1 en la población analizada

	Mujeres		Varones	
	n	%	n	%
TS + NTS (n = 81)	20.0	100.0	61.0	100.0
Naive (n = 53)	4.0	20.0	7.0	11.5
Tratados (n = 28)	0.0	0.0	8.0	13.1
Sólo TS (n = 53)	2.0	10.0	9.0	14.8
Naive (n =37)	2.0	10.0	7.0	11.5
Tratados (n =16)	0.0	0.0	2.0	3.3
Sólo NTS (n = 28)	2.0	10.0	6.0	9.8
Naive (n =16)	2.0	10.0	0.0	0.0
Tratados (n =12)	0.0	0.0	6.0	9.8

Nota: Los números en **negrita** indican los valores más altos por fila. TS = Trabajador(a) sexual. NTS = No trabajador(a) sexual.

5.13. Análisis de los factores epidemiológicos de los TS y NTS y su relación con la evolución molecular de VIH

De acuerdo a los eventos de evolución molecular caracterizados se realizó una evaluación del riesgo relativo (OR) y asociación mediante Chi-cuadrado (X^2) (Ver descripción en Materiales y Métodos) de acuerdo a su conducta de riesgo, con el fin de conocer si estos factores promueven la evolución molecular del VIH o constituyen un riesgo o relación con el trabajo sexual o no.

a) Análisis de riesgo

De acuerdo a la Tabla 18, se observó que ser TS representa un riesgo alto (OR = 2.1) para presentar resistencia primaria a los ARV (transmitida por otro individuo). Asimismo, la presencia de tratamiento ARV y tener CD4 < 200 células / mL constituyen factores de riesgo elevado para generar resistencia, específicamente resistencia adquirida.

De lo contrario, algunas características epidemiológicas son factores de protección (OR = 0.2) como el hecho de consumir drogas recreativas que protegen frente a la resistencia adquirida (por efecto de los ARV) o tener CV > 1000 copias / mL que protegen frente a una recombinación.

Con el fin de conocer si entre eventos de evolución molecular podría haber un factor de riesgo, es decir una relación de dependencia entre ellos, se hizo también el análisis de OR. De acuerdo a los hallazgos de la Tabla 19, la presencia de infección mixta de variantes genéticas de VIH constituye un riesgo elevado para la presencia de resistencia en general. Asimismo, la presencia de cepas con resistencia, específicamente resistencia primaria es un factor de riesgo para la presencia de recombinación y cepas con tropismo R5.

b) Análisis de asociación

Con el fin de corroborar la asociación estadísticamente significativa de las variables epidemiológicas de la población estudiada con los eventos de

evolución molecular descritos en el presente trabajo, se realizó un análisis de asociación con un CI de 95%, tal como fue descrito en metodología.

De acuerdo a los hallazgos, se identificó que la población de TS estuvo asociada con la presencia de variantes con tropismo R5 ($p = 0.04$) (Tabla 20). Sin embargo, solo en aquellos individuos que ejercían el trabajo sexual se encontró además una asociación con la presencia de resistencia primaria o transmitida ($p = 0.04$). Asimismo, se identificó que la presencia de contacto sexual con clientes extranjeros estuvo asociada con la resistencia adquirida (por consumo de ARV, $p = 0.05$) y que el uso de drogas recreativas o ilegales se asoció con eventos de recombinación entre cepas virales circulantes ($p = 0.05$).

Al asociar los eventos de evolución molecular entre sí, se identificó que los eventos de resistencia, especialmente resistencia primaria estuvieron asociados con infecciones mixtas de VIH ($p = 0.001$), y que las cepas con tropismo R5 se asociaron con eventos de recombinación ($p = 0.001$) y resistencia a los ARV (0.001) (Tabla 21).

Tabla 18
Índice de riesgo absoluto (OR) entre los eventos de evolución molecular de VIH-1 y los factores epidemiológicos identificados en la población de estudio

Evento molecular → Factor de riesgo ↓	Infección Mixta	Recombinación	Resistencia en general	Resistencia primaria	Resistencia adquirida	Mutaciones no conservadas en Región de Alta Homología (MHR)	Tropismo R5
Servarón	0.92	0.43	1.22	0.66	ND	0.65	0.78
Ser Trabajador Sexual	1.39	0.69	0.95	2.10	0.20	0.77	1.41
Tener contacto sexual con extranjeros	0.46	0.83	1.45	1.28	ND	1.28	1.51
Consumo de drogas recreativas	0.73	0.32	0.51	0.83	0.00	0.00	1.03
Tener tratamiento ARV	0.41	0.78	2.10	ND	ND	1.17	0.80
Tener CD4 ≤ 200	1.77	0.90	2.88	0.93	2.40	0.93	1.03
CV ≥ 1000 (n = 18)	ND	0.20	1.13	ND	1.20	ND	0.60

Tabla 19

Índice de riesgo absoluto (OR) entre eventos de evolución molecular de VIH en la población analizada

Evento molecular → ↓	Infección Mixta	Recombinación	Resistencia en general	Resistencia primaria	Resistencia adquirida	Mutaciones no conservadas en Región de Alta Homología (MHR)	Tropismo R5 de VIH
Infección mixta	ND	0.68	2.00	ND	0.00	1.15	0.95
Recombinación	0.68	ND	1.33	1.71	0.58	0.81	1.31
Resistencia en general	2.00	1.88					1.37
Resistencia primaria	ND	2.57	ND				2.80
Resistencia adquirida	0.00	0.87					0.36
Mutaciones no conservadas en Región de Alta Homología (MHR)	1.15	0.81	1.13	1.67	0.56	ND	0.85
Tropismo R5	0.95	2.73	1.94	2.80	1.88	1.41	ND

Nota.- Los valores remarcados en **negrita** indican que la variable representa un beneficio grande (0 - 0.2) o un riesgo elevado (> 2.0) de acuerdo al factor de riesgo analizado. ND = No determinado.

Tabla 20							
Índice de asociación (Chi ²) entre los eventos de evolución molecular de VIH-1 y los factores de riesgo de la población analizada							
Evento de evolución molecular →	Infeción Mixta	Recombinación	Resistencia a los ARVs en general	Resistencia primaria	Resistencia adquirida	Mutaciones no conservadas en la Región de Mayor Homología (MHR)	Tropismo viral R5
Factor de riesgo ↓							
Sexo	0.90	0.11	0.76	0.6	0.17	0.52	0.13
Trabajo sexual	0.56	0.46	0.16	0.6	0.08	0.65	0.04
Ejercer el trabajo sexual	0.44	0.86	0.21	0.04	0.43	0.23	0.00
Contacto sexual de riesgo con clientes extranjeros	0.33	0.76	0.54	0.75	0.05	0.73	0.10
Consumo de drogas recreativas	0.60	0.05	0.27	0.78	0.09	0.60	0.85
Tener tratamiento ARV	0.19	0.65	0.21	ND	ND	0.79	0.16
CD4 ≤ 200 células / mL	0.43	0.87	0.13	0.95	0.47	0.95	0.90

Nota.- Los números remarcados en **negrita** indican los valores *p* estadísticamente significativos de acuerdo al IC = 95%, ND = No determinado.

Tabla 21

Índice de asociación entre los eventos de evolución molecular de VIH en la población analizada

Evento molecular identificado	Infección Mixta	Recombinación	Resistencia a los ARV en general	Resistencia primaria	Resistencia adquirida	Mutaciones no conservadas en la Región de Mayor Homología (MHR)	Tropismo viral R5
Infección mixta							
Recombinación	0.54						
Resistencia a los ARV en general	0.01	0.61					
Resistencia primaria	0.00	0.28					
Resistencia adquirida	0.19	0.88					
Mutaciones no conservadas en la Región de Mayor Homología (MHR)	0.82	0.76	0.75	0.60	0.64		
Tropismo viral R5	0.77	0.00	0.00	0.35	0.53	0.65	

Nota.- Los números remarcados en **negrita** indican los valores *p* estadísticamente significativos de acuerdo al IC = 95%. ND = No determinado.

6. DISCUSIÓN

En la presente tesis se ha realizado el estudio de la evolución del VIH a través del análisis de los diferentes eventos moleculares que influyen sobre este proceso. Para tal efecto, se seleccionaron dos poblaciones de sujetos infectados con diferente conducta de riesgo de infección por VIH: una población de trabajadoras y trabajadores sexuales identificados como TS y una población de sujetos militares que no practican el trabajo sexual denominado NTS. En ese sentido, se siguió un diseño de tipo transversal con el fin de evaluar los eventos moleculares ocurridos en ambas poblaciones utilizando como marcadores moleculares los genes *gag*, *pol* y *env*. En la primera parte del estudio se analizó el resultado de PCR realizado por cada marcador molecular y seguidamente los resultados obtenidos a partir de la secuencia de los marcadores analizados.

6.1. La presencia de muestras no reactivas a PCR sugiere la presencia de un mayor grado de polimorfismo genético en algunos genes de VIH

Los primeros resultados de PCR revelaron que ningún marcador genético seleccionado pudo ser amplificado con un 100% de sensibilidad, sugiriendo dos posibilidades: 1) Problemas en la calidad del ADN extraído; 2) Falla en el apareamiento de bases del sitio de unión del *primer* con la secuencia objetivo.

Con respecto al primer punto, solo se obtuvo problemas de calidad de ADN a partir de dos muestras infectadas según los datos de la amplificación del gen constitutivo de la β -globina, lo cual fue corregido satisfactoriamente mediante una repetición así como también la inclusión de otros métodos de extracción basados en columna. En consecuencia, la falta de amplificación en algunas muestras no pudo estar relacionada con la presencia de inhibidores o degradación del ADN genómico, sino más bien a problemas de apareamiento del primer con la secuencia objetivo del ADN genómico.

Al respecto, todos los *primers* seleccionados fueron obtenidos considerando diferentes artículos y manuales técnicos que son referencia internacional para la identificación de la diversidad genética (genes *gag* y *env*) (Van der Auwera & Heyndrickx, 2000; Delwart *et al.*, 1995). Otro grupo fue seleccionado por su importancia en la identificación de la resistencia molecular a los antirretrovirales

(genes *prt*, *tr* y región *pol*). (Boden *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 2000; HIV genotyping manual, 2008).

Con respecto a la sensibilidad del PCR para los genes *gag* y *env*, diversos autores han obtenido valores entre 93 y 100% (Cham *et al.*, 2000^a; Cham *et al.*, 2000b; Heyndrickx *et al.*, 2000), mientras que en este estudio fue de 73% para *gag* y 80.7% para *env*. La baja sensibilidad obtenida a partir de muestras peruanas usando estos *primers* de referencia sugiere que el VIH en el Perú podría presentar divergencias genéticas por lo menos en los sitios de unión al primer en comparación con cepas extranjeras. En consecuencia, estos datos sugieren la necesidad de diseñar nuevos *primers* de acuerdo a la secuencia genética de los aislamientos peruanos.

De manera interesante, se observó que el PCR presentó menor sensibilidad (58%) cuando se amplificó la región *pol* en comparación los demás marcadores genéticos evaluados. Al respecto es importante señalar que del total de muestras amplificadas para *pol*, se obtuvo mayor porcentaje de amplificación a partir de NTS (63%, 20/32) que en TS (51%, 31/61). Estos hallazgos sugieren que en poblaciones con comportamiento sexual de alto riesgo podría haber un mayor grado de polimorfismo genético disminuyendo la sensibilidad de la PCR.

De otro lado, estos datos podrían ser considerados también al momento de diseñar nuevas metodologías *in house* basadas en PCR convencional para el diagnóstico molecular de VIH. De acuerdo a los resultados, el gen *env* mostró ser el marcador más conservado, por lo que podría ser seleccionado como primera opción para el diseño de un sistema de PCR específico para VIH. Sin embargo, también se requieren estudiar otras secuencias genéticas altamente conservadas, como las regiones LTR y otras secuencias promotoras, con el fin de evaluar con mayor criterio el mejor marcador de detección para VIH.

6.2. El análisis de la diversidad genética del gen *env* reveló que podría haber un proceso de selección positiva del VIH debido a una reciente transmisión en la población

Los datos de diversidad genética se obtuvieron a través del *Test* de Neutralidad de Tajima (1989). Este *test* permite distinguir los cambios genéticos que ocurren aleatoriamente (considerados por este *test* como neutrales) de aquellos que no se deben al azar sino debido a la selección. En este caso, los valores obtenidos de acuerdo al estadístico D de Tajima, pueden distinguir estos cambios ya que si son negativos indican que la población ha experimentado un cuello de botella reciente (Tajima, 1989). De acuerdo a los resultados, los valores de D de Tajima obtenidos en todos los genes fueron negativos aunque no significativos, lo que podría indicar que los cambios genéticos que experimentaron las muestras virales de este estudio ocurrieron debido a un proceso de selección. Al analizar cada uno de los parámetros que incluye este *test*, es importante señalar que la diversidad genética a nivel de nucleótidos fue mayor en el gen *env*. En concordancia con este hallazgo, se ha demostrado que la variabilidad de VIH ocurre con mayor frecuencia en este gen y que al estar relacionado con el progreso de la enfermedad, también podría deberse a un proceso de selección intra-hospedero y no solamente a la deriva genética (Castro-Nallar *et al.*, 2012).

Asimismo, se determinó en este estudio que la tasa dN/dS fue hallada en el intervalo de 0.40 a 0.66. Estos valores generalmente obedecen a que el número de dN son menores que dS, y que por lo tanto las mutaciones sinónimas tienen mayor probabilidad de fijarse, lo que permite discriminar un proceso neutral de evolución. En contraste, mientras más cercano sea este número a uno, mayor es el índice de mutaciones no sinónimas, lo que desencadena un proceso evolutivo de selección positiva (Posada *et al.*, 2001). Al respecto, el análisis del gen *env* en la población de TS y NTS mostró el menor valor de tasa de transversiones y transiciones, lo que corresponde con el hecho de presentar el mayor número de cambios no sinónimos en comparación con los genes *gag* y *pol*. Estos hallazgos concuerdan con evidencias en los que se ha demostrado que el gen *env*, específicamente la región hipervariable V3 se encuentra en un proceso de selección positiva, debido a la remoción o reemplazo de aminoácidos de epítopes

de células B (Holmes *et al.*, 1992). Asimismo, Piantadosi *et al.*, (2009) demostraron a partir de una población de 37 secuencias de *env* obtenidos de pacientes kenianos, una tasa de dN/dS en el rango de 0.3 a 2.7 con evidencia de evolución adaptativa. Por tanto, si bien el valor de dN/dS de *env* sigue siendo menor que uno en la población de TS y NTS, existe una pequeña proporción de mutaciones no sinónimas que estarían fijándose en la población viral y que cumplirían funciones importantes de reconocimiento humoral o de respuesta celular específica.

Con relación al valor negativo del estadístico D de Tajima, si bien aparecen en todos los genes analizados del presente trabajo, no es posible asegurar que se trata de valores significativos. Este valor según Tajima (1989) indica eventos de cuello de botella los cuales podrían estar relacionados a la presencia de mutaciones no sinónimas así como de inserciones y delecciones (Tajima, 1989). En nuestro análisis, hemos identificado numerosas mutaciones a nivel de los tres genes analizados, los cuales presentaron delecciones e inserciones, principalmente en el gen *env* (Anexo 1). La presencia de estas mutaciones podría indicar recientes eventos de selección, sin embargo para demostrar que se trata de episodios recientes de “cuello de botella” es necesario profundizar el estudio de las subpoblaciones virales a través de secuenciamiento masivo. Otro factor relacionado con este hecho podría ser la presencia de eventos de reciente transmisión viral, los cuales generan un decrecimiento del tamaño efectivo de la población viral en un 97% durante la transmisión del virus de un individuo a otro tal como fue demostrado por Vrancken *et al.* (2015) a través del estudio del gen *env*. Esta reducción trae consigo un cuello de botella en la población de VIH y se caracteriza por la presencia de un predominio de cepas virales R5, las cuales aparecen durante la primo-infección (Weber *et al.*, 2006).

En general, el análisis de diversidad a nivel de genes determinó que *env* presentó una mayor presión de selección y diversidad en comparación con los otros genes, lo cual ocurrió de manera similar TS y NTS.

6.3. La alta diversidad genética del VIH en el grupo de TS podría deberse al comportamiento de riesgo de esta población

Los datos de diversidad a nivel de nucleótidos (π) revelaron que el VIH infectando el grupo de TS presentó un mayor índice que los que infectaron a los NTS. Estos hallazgos concuerdan con los reportados por Vrancken *et al.* (2015), quienes demostraron diferencias de variabilidad genética significativas entre grupos humanos con distinto comportamiento sexual de riesgo de infección por VIH, tales como hombres que tiene sexo con otros hombres y heterosexuales. Estas diferencias según indica el estudio estarían relacionadas con las tasas de transmisión del virus que difiere en cada grupo. De hecho, al comparar el comportamiento sexual de ambas poblaciones TS y NTS, se pueden encontrar algunas características que solo presentan los TS, tales como contacto sexual con extranjeros, ejercicio del trabajo sexual en condición de VIH/SIDA, consumo de drogas y otros factores que podrían ser determinantes en incrementar la tasa de variabilidad genética del virus en la población de TS.

Es importante indicar que las cepas virales que infectaron a la población de NTS presentaron una mayor diversidad a nivel del gen *pol* en comparación del grupo de VIH provenientes de TS. Al respecto cabe indicar que a diferencia de los genes *gag* y *env*, la presión de selección ejercida sobre el gen *pol* está centrada principalmente en el tratamiento antirretroviral que ejerce una acción inhibitoria contra la proteasa y la transcriptasa reversa, enzimas codificadas por este gen (Clutter *et al.*, 2016). Asimismo, se ha identificado que la acción del sistema APOBEC3, un sistema de protección antiviral primigenio, (discutido más adelante con mayor detalle) ejerce un mecanismo de hipermutación sobre esta región incrementando su variabilidad (Rhee *et al.*, 2016). Todos estos eventos en su conjunto podrían ayudar a explicar la alta diversidad de *pol*, el cual evidentemente no está ligado con el comportamiento sexual de riesgo.

En general, la información genética del VIH analizada en la población de TS y NTS muestra evidencia de presión de selección a nivel del gen *env*, siendo un factor importante para el incremento de la diversidad genética del virus en el grupo de TS, y que estaría relacionado con el comportamiento de riesgo de esta población.

6.4. La predominancia del subtipo B en muestras peruanas podría deberse a un proceso de expansión epidemiológica desde otros países de la región

De acuerdo a los resultados de análisis filogenético se ha observado que el 100% de las muestras de VIH, tanto en TS como NTS fueron subtipo B. Estos hallazgos revelan que la presencia de este subtipo es predominante tanto en población de Trabajadoras sexuales Trans como en población general peruana, concordando con los datos de subtipos realizados previamente en nuestro país (Russell *et al.*, 2000, Montano *et al.*, 2005, Laguna-Torres *et al.*, 2005, Yabar *et al.*, 2012). De acuerdo a dichos estudios, en la población peruana el subtipo B de VIH es predominante en un 98%, seguido del F (1%) y otros subtipos como el A, C y H (1%). Es importante señalar que el subtipo B ha sido relacionado con poblaciones de hombres que tienen sexo con otros hombres (HSH) en Argentina (Montano *et al.*, 2005) lo cual podría explicar la predominancia de esta cepa en la población de TS, y su concomitante expansión a la población general a través de grupos humanos con características de alto riesgo de infección por VIH.

Diversos estudios han intentado identificar algún factor de riesgo asociado a la transmisión de este subtipo en la población. Montano *et al.* (2005) determinó que la recurrencia de infecciones de transmisión sexual (ITS) en la población HSH y el uso de drogas intravenosas (UDI) en el grupo de TS femeninas son los principales factores de riesgo asociados con el predominio de subtipo B. Sin embargo estas características no fueron frecuentes en la población estudiada, y en referencia al UDI no se ha encontrado evidencia de su práctica en el grupo de TS. Con relación a ello, Couto-Fernandez *et al.* (2006) determinó que el subtipo F estaba asociado a la población UDI, mientras que B fue encontrado con baja frecuencia en este grupo de riesgo. Previamente Avila *et al.* (2002) reportó con una alta significancia que la presencia del subtipo F en Argentina estuvo relacionada con población heterosexual y con UDI. Mientras que el subtipo B fue hallado con mayor frecuencia en HSH. Estos datos discordantes entre países de la región demuestran que la dinámica de transmisión del virus sigue cursos diferentes de acuerdo a las características epidemiológicas de la población infectada, lo cual está ligado a factores socio-culturales que podrían influenciar el predominio de un subtipo sobre otro. Al respecto, Russel *et al.* (2000) y Laguna *et al.* (2005) demostraron que la

distribución de los subtipos en la región está dividido en dos grupos: el subtipo B el cual predomina en países de la región andina como Perú, Ecuador, Venezuela y Colombia; mientras que el subtipo F y las formas recombinantes B/F predominan en Uruguay, Argentina y Paraguay. Por tanto, la información de los comportamientos de riesgo y su vigilancia por parte de las entidades de salud pública en cada país podrían ayudar a controlar la epidemia y expansión de los subtipos de acuerdo a su origen.

De otro lado, es importante señalar que el subtipo B es la variante más frecuente en toda la región, pero la explicación de esta evidencia aún no está muy clara. Al respecto, se postula que países como Brasil, Argentina y Venezuela vienen tomando un rol importante en la expansión de este subtipo, debido a que dichos países son puntos de constante migración con otros Estados de la región (Junqueira *et al.*, 2016). Si bien es cierto que el subtipo B ha quedado establecido en el Perú desde su primera caracterización (Russell *et al.*, 2000), probablemente el rol de los HSH-TS habría sido determinante para asegurar la circulación de esta variante en la población general.

Con respecto a la patogenicidad del subtipo B y sus implicancias con la salud pública, no existen evidencias que demuestren que la infección por esta variante podría acarrear un rápido progreso a SIDA. Sin embargo, existen estudios *in vitro* que han demostrado un mayor nivel de replicación viral del subtipo B en comparación con el C (Iordanskiy *et al.*, 2010) lo que podría marcar diferencias en la patogenicidad de ambas variantes. En consecuencia, el predominio del subtipo B en el Perú y en América en general podría también estar asociado a su alta capacidad replicativa que asegura su expansión y alta prevalencia.

Por último, es importante señalar que la definición del subtipo B a través de los datos filogenéticos fue totalmente clara, mostrando valores *bootstrap* en intervalos de 60% y 70%. Estos valores presentes en cada clado, si bien no son altos, sugieren la presencia de tramos de recombinación genética intra e inter-subtipos que aparecen frecuentemente en VIH (Zhang *et al.*, 2010) y que se discutirá a continuación.

6.5. Recombinación en cepas peruanas de VIH favorece su evolución

Los hallazgos de este estudio revelan la presencia de recombinación en todos los marcadores estudiados (*gag*, *env* y *pol*) de las muestras de VIH peruanas. Según los hallazgos de este estudio, existen tramos de recombinación entre el subtipo B y los subtipos A, C, D, F y G lo cual sugiere la presencia de virus recombinantes circulando en la población de TS y NTS. Este hallazgo podría tener un gran impacto clínico y epidemiológico en nuestro país debido a que la recombinación incrementa la diversidad del VIH acelerando su proceso evolutivo (Rambaut, 2004), mejora la capacidad replicativa e incrementa la tasa de resistencia a los antirretrovirales (ARV) (Zhang *et al.*, 2010).

Según los resultados de recombinación de acuerdo al marcador genético analizado, se observó que hubo una mayor frecuencia en el gen *env*. A diferencia de otros trabajos donde se encontró una mayor frecuencia de “sitios de recombinación” en *gag* y *pol* (Zhuang *et al.*, 2002), es probable que estos datos difieran con los hallados en este estudio debido a que la mayoría de plataformas de bioinformática son simuladores, y que al ser repetidos *in vitro* no siempre se van a comportar de manera similar. Sin embargo, el hecho que exista una menor tasa de recombinación en la región *pol* podría estar relacionado con la presencia de sitios y dominios catalíticos cuya conservación es importante para mantener la funcionalidad de la proteína enzimática.

De otro lado, se observó que dentro de las formas recombinantes de VIH, la más común fue del tipo B/D, presente predominantemente en la población de NTS. Este tipo de recombinación está dado por la co-existencia de los subtipos B y D; este último recién caracterizado y establecido en Brasil cuyo antecesor más próximo se habría originado en Sudáfrica (Couto-Fernandez *et al.*, 2006). El hallazgo de formas recombinantes con el subtipo D sugiere que esta variante habría perdido su condición de “cepa pura”, por lo que habría adoptado nuevas características replicativas al mezclarse con el subtipo B. Al respecto es importante señalar que el subtipo D ha sido asociado con un rápido progreso a SIDA (Fouchier *et al.*, 1992) y ser una variante con una mayor patogenicidad en comparación con el subtipo A

(Emiliani *et al.*, 1994). Esta información podría sugerir que las formas recombinantes B/D halladas en este estudio presentarían características similares de patogenicidad con el riesgo de desencadenar un rápido progreso a SIDA. Sin embargo, se requieren mayores estudios para demostrar esta hipótesis.

6.6. La presencia de infecciones mixtas en TS y NTS ayudaría a comprender los procesos de resistencia y recombinación genética de VIH en ambas poblaciones

Como se mencionó en resultados, en el presente trabajo se ha encontrado evidencia de infecciones mixtas a partir 93 individuos con diferente conducta de riesgo. De manera importante, los análisis determinaron que la proporción de casos fue similar entre ambas poblaciones (TS: 20%, 12/61 y NTS: 19%, 6/32).

Estos datos sugieren que a pesar de hallar diferencias de comportamiento sexual entre las poblaciones de TS y NTS, la probabilidad de presentar una infección mixta en ambas poblaciones es similar. Esta información concuerda con otros estudios donde se ha demostrado una alta frecuencia de infecciones mixtas en sujetos considerados como población de bajo riesgo (Koelsch *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 2002; Diaz *et al.*, 1995).

Con relación a la población de TS, se cuenta con evidencias que la frecuencia de infecciones mixtas es alto, especialmente donde la prevalencia de VIH es alto como es el caso de algunos países de Africa (Manigart *et al.*, 2004; Grobler *et al.*, 2004; Fang *et al.*, 2004). En consecuencia, la ocurrencia de casos a partir de TS en nuestro país es importante, por lo que su relación con la transmisión en la población general requiere ser estudiada con mayor profundidad.

De otro lado, la importancia de monitorear la presencia de infecciones mixtas en la población recae en su relación con el progreso a SIDA. Al respecto, existen reportes donde se ha demostrado que la respuesta inmunológica se ve afectada negativamente frente a una nueva infección con una variante filogenéticamente diferente. (Jost *et al.*, 2002, Gottlieb *et al.*, 2004). En consecuencia, el análisis de este evento podría ser importante para priorizar la atención de los pacientes afectados.

Se ha identificado en este estudio, que la presencia de infecciones mixtas en TS está relacionado con la presencia de resistencia a los ARV. En concordancia con estos hallazgos, existe evidencia que estos eventos ayudan a promover la re-infección con cepas resistentes a los antirretrovirales (Koelsch *et al.*, 2003). Esta información ayudaría a identificar la presencia de resistencia transmitida a los antirretrovirales y aportaría con información útil para la identificación de focos de transmisión de cepas resistentes en la población afectada.

Cabe resaltar que las infecciones mixtas podrían influir de manera importante en el proceso de recombinación del virus tal como fue demostrado previamente (Fang *et al.* 2004). En consecuencia, al identificar los eventos de recombinación en la población estudiada, se está midiendo de manera indirecta la tasa de eventos de infecciones mixtas que ocurrieron anteriormente. En la presente tesis, se ha identificado que el comportamiento sexual de riesgo en este grupo podría ser un factor que ayudaría a incrementar la variabilidad genética del VIH y, en consecuencia, su evolución. En el análisis de casos de infecciones mixtas dentro de la población TS, la mayoría de los casos correspondió a población masculina (n = 9, datos no mostrados). Al analizar con detalle el comportamiento sexual de riesgo de ambos sexos se podrá apreciar que el 50% de TS de sexo femenino dejan de practicar la prostitución después de conocer su diagnóstico, mientras que en varones solo el 20% (Yabar *et al.*, 2005). Esta conducta de riesgo podría incrementar la probabilidad de superinfección y recombinación entre cepas virales y por tanto generar una mayor variabilidad genética, tal como se ha encontrado en el presente estudio.

6.7. Tropismo de VIH y su relación con la patogenicidad en la población estudiada

El análisis de tropismo fue realizado mediante el estudio del gen *env* el cual codifica un complejo proteínico denominado gp120/gp41 el cual permite la interacción del virus con el linfocito T durante la fase de infección (Wyatt & Sodroski, 1988). Este complejo presenta una región denominada V3-loop de 35 aminoácidos, la cual

cumple un rol importante en el reconocimiento del receptor CCR5 de la célula hospedera (Huang *et al.*, 2005).

Esta fase de reconocimiento del receptor CCR5 generalmente ocurre en la fase temprana de la infección por VIH, y se denomina tropismo por el receptor CCR5. Los virus con estas características se denominan cepas virales R5. Por el contrario, durante la fase tardía de la enfermedad, el VIH cambia su tropismo y sólo reconoce células con receptores CXCR4, denominándose virus X4 (An & Winkler, 2010).

Los últimos estudios revelan que la región V3 es importante para determinar el tropismo del VIH, y en la actualidad viene siendo estudiada en la práctica clínica para la administración de fármacos que actúan como inhibidores de entrada del virus, siendo el más conocido el Maraviroc (Edwards *et al.*, 2015).

De acuerdo con ello, los hallazgos de este estudio revelaron que en la población de VIH en general la mayoría de las cepas presentaron tropismo R5 lo que concuerda con lo descrito en la literatura (Weber *et al.*, 2006). Asimismo, la presencia de cepas R5 en la población estudiada sugiere infección temprana del virus tanto en TS como NTS, y como consecuencia las cepas podrían haber pasado por un cuello de botella reciente tal como lo evidencian estudios previos (Vrancken *et al.*, 2015). Esta información concuerda con el análisis de la tasa de dN/dS del gen *env* cuyo índice fue mayor que *gag* y *pol*.

Con relación a las cepa X4, se ha identificado que su presencia en la población estudiada representa solo el 33%; sin embargo, en la mayoría de los casos estudiados se encuentra relacionada a una alta carga viral y un bajo recuento de CD4 (< 200 células / μ L) en comparación con las cepas R5. Estos hallazgos sugieren que este tipo de variante de VIH muestra una alta capacidad de patogenicidad en comparación con las cepas R5. En concordancia con estos datos, se ha demostrado que la presencia de la cepa X4 en pacientes infectados generalmente está asociada con un mal pronóstico de la enfermedad, ya que los pacientes pueden progresar a SIDA rápidamente (Verhofstede *et al.*, 2012). Esta característica ha sido analizada *in vitro* e *in vivo*, demostrándose que las cepas X4 son capaces de generar un declive de la población de células CD4 y un incremento

acelerado de la carga viral en los pacientes afectados (Berger *et al.*, 1999). La patogenicidad de X4 si bien no está aún muy entendida, podría deberse a su capacidad de infectar una mayor variedad de células del hospedero que las variantes R5, lo que incrementa su capacidad de infección y su replicación especialmente en etapas tardías de la enfermedad (Bleul *et al.*, 1997). De otro lado, se sostiene que en un momento tardío de la enfermedad, la respuesta inmunológica sufriría un declive que permitiría que las cepas X4 evolucionen y se repliquen rápidamente (Philpott, 2003).

En este estudio se ha demostrado que los dos linajes co-infectantes de VIH correspondientes a la muestra BM61 (del grupo de TS), presentaron tropismo R5, lo que sugiere que la infección fue relativamente reciente y que al haber ocurrido por ambos linajes, la co-infección habría sido simultánea. Este fenómeno donde ocurre infección mixta simultánea de dos cepas virales no emparentadas filogenéticamente ya ha sido previamente descrito (van der Kuyl & Cornelissen 2007).

Finalmente es importante indicar que la caracterización del tropismo del VIH actualmente se viene utilizando como una prueba de genotipificación para la identificación de pacientes candidatos a recibir el fármaco Maraviroc (Weber *et al.*, 2006). Por tanto, la información de las condiciones de estandarización y análisis de los resultados presentados en este estudio permitirá implementar una metodología *in house* que pueda ser aplicado para la selección de pacientes candidatos a recibir este fármaco.

6.8. La presencia de mutaciones deletéreas en sitios conservados de VIH sugiere efectos sobre la capacidad replicativa de estos virus

Otro aspecto importante de los efectos de la recombinación sobre la evolución molecular del virus es su relación con el incremento de la capacidad infectiva del virus (Konings *et al.*, 2006). Con el fin de conocer si el VIH circulando en TS y NTS presentó cambios genéticos implicados con su capacidad infectiva, se realizó una búsqueda de mutaciones a nivel del dominio conservado de la región de alta

homología (MHR) codificado por el gen *gag*. Al respecto, el dominio p24-p7 de la proteína Gag que incluye la región MHR ha sido implicado en diferentes procesos de la replicación tales como en la unión específica con el ARN viral (Urbaneja *et al.* 1999), en la síntesis de la hebra complementaria durante la transcripción reversa (Cen *et al.* 1999; Feng *et al.* 1999), en el ensamblaje y maduración del virus (Dawson & Yu, 1998), liberación y capacidad infectiva del virión (Reicin *et al.*, 1995).

Esta región presenta sitios conservados que le permite participar en funciones tales como el proceso de empacamiento del ARN viral (Berkowitz *et al.*, 1996) y ensamblaje de la partícula viral. Asimismo, la secuencia analizada en este estudio del gen *gag* abarcó una región que codifica dominios de dedos de zinc implicados en los procesos de infección temprana (Gorelick *et al.*, 1999), así como también la presencia de una región de alta homología de funciones relacionadas con el correcto ensamblaje del virus (Mammano *et al.*, 1994).

Al analizar esta secuencia, se encontraron de manera interesante mutaciones de tipo no conservativas en el dominio p24-p7 de Gag, especialmente las mutaciones R167G, Q155T y E159K. Con referencia a la mutación R167G no se han reportado estudios al respecto; sin embargo, existen evidencias por las cuales las mutaciones Q155T y E159K evitan el procesamiento de los productos finales de Gag truncando la formación de la estructura en forma de cono del virus y generando concomitantemente letalidad del VIH (Mammano *et al.*, 1994; Dorfman *et al.*, 1994). De manera interesante, la muestra que presentó mutaciones en esta región también contenía tramos de recombinación intra-genética, sugiriendo que en este caso dicho virus evolucionó por recombinación, aunque no de manera favorable.

En general, la causa de estas mutaciones en dichas regiones conservadas no es muy clara, sin embargo podría guardar relación con los procesos de selección viral debido a la alta transmisión inter-hospedero presente en la población de TS. Por tanto, se requiere la continuación de las investigaciones mediante estudios inmunológicos y de infectividad *in vitro* con el fin de demostrar las implicancias de estas mutaciones en el VIH.

6.9. La hipermutación ocurre con mayor frecuencia a nivel de ADN proviral y estaría involucrada en la generación de resistencia a los antirretrovirales en VIH

En el presente estudio se ha logrado identificar un caso de hipermutación a partir de una muestra de TS, el cual presentó una alta frecuencia de cambios de A por G y numerosas mutaciones deletéreas. Al respecto, es importante mencionar que los eventos de hipermutación mediado por el Complejo de Edición similar al Polipéptido Catalítico de la Enzima Editora del ARNm de la Apolipoproteína B-3 o APOBEC3 por sus siglas en inglés, han sido previamente identificados en la naturaleza y ocurren cuando la proteína viral Vif (por su siglas en inglés *Virion Infectivity Factor*) se vuelve no funcional (Harris & Dudley, 2015). En condiciones normales de infección, Vif promueve la ubiquitinación del complejo APOBEC3, el cual es conducido al Proteosoma que finalmente desencadenará su degradación (Marin *et al.*, 2003). Sin embargo, cuando Vif está mutado, ya no actúa eficientemente sobre el complejo APOBEC3 lo que permite llevar a cabo su proceso de edición a través del mecanismo de deaminación (edición de A por G), generando virus defectuosos y deletéreos (Lecossier *et al.*, 2003).

En esta muestra en particular, el alto índice de codones de detención (stop) y mutaciones inusuales (o raras) habrían generado efectos deletéreos para dicha variante viral. Sin embargo, los datos hallados en esta tesis demostraron que este virus estuvo presente en el plasma del paciente con niveles por encima de las 1000 copias / mL de carga viral, lo que sugiere la presencia de replicación viral evidente. Al realizar el análisis del virus a partir de ARN (virus circulante en el plasma del paciente), se evidenció que no hubo hipermutación y que este fenómeno solo habría acontecido a nivel de provirus (ADN viral integrado en el ADN humano). En concordancia con estos hallazgos diferentes reportes demostraron que la hipermutación y las mutaciones deletéreas implicadas en eliminar la funcionalidad de las proteínas son muy comunes a nivel de ADN proviral en comparación con el virus circulante en plasma (Rhee *et al.*, 2016) y que su presencia está relacionada con una supresión viral natural en el paciente infectado (Eyzaguirre *et al.*, 2013).

El hecho que la hipermutación solo se haya hecho evidente a nivel de provirus y no en el virus circulante en plasma sugiere la presencia de un evento de selección de tipo purificante, el cual habría seleccionado poblaciones virales libres de mutaciones deletéreas. Estos hallazgos concuerdan con Russell *et al.* (2009) quienes demostraron que el índice de hipermutación experimenta una reducción desde provirus (0.68%), luego ARN viral intracelular (0.19%) y finalmente virus circulante en plasma (0.08%).

Cabe resaltar que de acuerdo a los resultados observados, la presencia de hipermutación estaría contribuyendo a la diversidad genética del virus mismo en la muestra analizada al generar una alta frecuencia de mutaciones inusuales, mutaciones deletéreas y codones de detención. De hecho algunos estudios han determinado que no solo la tasa de error de la transcriptasa reversa contribuye con la diversidad genética del virus, sino también la hipermutación, la cual promueve una mayor variabilidad genética a nivel de ADN proviral, con una proporción 44 veces mayor al del virus circulante en plasma (Cuevas *et al.*, 2015).

Sin embargo, debido a la existencia de una selección purificante durante la evolución viral (Russell *et al.*, 2009), es probable que una gran población viral hipermutada no logre convertirse en virus circulante. Esto permite suponer que el mecanismo de APOBEC3 promueve la generación de provirus defectuoso, pero su contribución con la diversidad genética del virus circulante en plasma no es mayor en comparación con el que genera la transcriptasa reversa.

De otro lado, existen referencias que demuestran que la hipermutación podría contribuir con la resistencia a drogas antirretrovirales (ARV). Este hecho ha sido estudiado por diversos autores quienes han relacionado la hipermutación con la aparición de mutaciones de resistencia tanto *in vitro* (Mulder *et al.*, 2008) como *in vivo* (Neogi *et al.*, 2013). Cabe resaltar que algunas de estas mutaciones como la M184I y E138K fueron generadas por hipermutación *per se* en presencia de ARVs o sin ellos (Mulder *et al.*, 2008). Asimismo, se observó que muchas de las mutaciones de resistencia que se identificaron a nivel proviral se mantuvieron estables y estuvieron presentes a nivel de ARN (Neogi *et al.*, 2013). De acuerdo al análisis de los resultados en la muestra BF9, se observó la presencia de la mutación

V179D la cual confiere un nivel potencialmente bajo de resistencia frente a todos los INNTR. Si bien es cierto no es posible determinar si esta mutación apareció como consecuencia de la hipermutación, la información epidemiológica del paciente reveló que no había recibido terapia ARV alguna, lo cual sugiere la posibilidad que V179D habría aparecido producto de la hipermutación misma. Mayores estudios se requieren para demostrar que la mutación V179D está relacionada con este mecanismo.

En suma, estos hallazgos demuestran que la hipermutación en la muestra BF9 solo ocurrió a nivel proviral lo cual es un evento muy frecuente, y que la única mutación de resistencia V179D ocurrió tanto a nivel proviral como en fase de virus circulante en plasma. Dicha mutación podría haberse generado durante la hipermutación, debido a que el paciente infectado no presentaba tratamiento ARV.

6.10. El trabajo sexual podría favorecer la transmisión de cepas de VIH con características de resistencia a ARV

Siguiendo la historia evolutiva del VIH, se realizó un análisis de mutaciones de resistencia a ARV mediante el estudio de la región *pol* en la población de TS y NTS. Los análisis de genotipificación demostraron la presencia tanto de mutaciones de resistencia como de tipo compensatorias, las cuales han sido implicadas en restaurar la capacidad replicativa del virus, la misma que es afectada por la presencia de mutaciones mayores que confieren resistencia a ARV (Chen *et al.*, 1995). Por tanto, la presencia de estas mutaciones sugiere la existencia de otras directamente implicadas con resistencia a ARV o bien sugieren la selección de cepas con características de resistencia.

De otro lado, los análisis de genotipificación del gen *pol* demostraron una alta tasa de resistencia tanto en individuos con tratamiento como en aquellos vírgenes de tratamiento (pacientes *naïve*). Al haber evidencias de infecciones mixtas en esta población, es probable que muchas cepas resistentes estén diseminándose en la población general empezando con los clientes sexuales. Esta afirmación se apoya en el hallazgo de cepas de VIH resistente a ARV en individuos vírgenes de tratamiento, hecho conocido como resistencia primaria y cuyos casos

recientemente han sido reportados por otros autores (Tozzi *et al.*, 2005; Cane, 2005; Hicks, 2005). De acuerdo a estos estudios, la principal causa de resistencia primaria es la transmisión de cepas de VIH resistentes a ARV provenientes de otro sujeto infectado. Al respecto, este trabajo encontró una relación estadísticamente significativa entre resistencia primaria e infecciones mixtas, lo que sugiere que en la población de TS, la infección simultánea o progresiva de múltiples variantes de VIH trajo como consecuencia la resistencia primaria frente a los ARVs en los sujetos afectados. El hecho que en la población de TS haya un alto índice de resistencia primaria (17%) con una alta probabilidad de haber ocurrido por una infección mixta, sugiere la existencia de contacto sexual de riesgo, es decir sin preservativo. Esta conducta de riesgo ya ha sido reportada previamente en hombres trabajadores sexuales de España, donde el uso del preservativo en HSH disminuyó de 97 a 92% entre los años 2010 y 2015, conducta asociada con la transmisión de VIH (Ballester-Arnal *et al.*, 2016). Cabe señalar que en el presente estudio no se cuenta con información sobre la frecuencia del uso del condón y su relación con la infección o re-infección por VIH.

Sin embargo, se ha demostrado recientemente que en HSH atendidos en el CERITS “Alberto Barton” del Callao, el 33.2% (13/38) de ellos no usaban condón y que era uno de los principales factores de transmisión de VIH (Clark *et al.*, 2008). En este mismo estudio se determinó que una de las razones relacionadas con el bajo uso del condón era su costo propiamente dicho. Asimismo, se determinó que el solo hecho de exigir el uso del preservativo por parte del TS sugería que el individuo estaba infectado con VIH lo que generaba un clima de estigmatización (Clark *et al.*, 2008). Del mismo modo, un trabajo que abarcó una mayor revisión de la información respecto al trabajo sexual en HSH reveló que en este grupo habían dificultades en negociar el uso del preservativo durante el trabajo sexual lo cual daba como consecuencia una alta tasa de contacto sexual sin protección (Baral *et al.*, 2015). Estos datos en general sugieren que de manera similar a otros grupos de HSH TS, la población analizada en este estudio podría presentar un bajo índice de uso del preservativo, lo que ayudaría a explicar la presencia de re-infección con otras variantes de VIH o infecciones mixtas en la población estudiada.

En el caso de la transmisión de cepas virales con resistencia a los ARVs, podrían provenir de clientes o compañeros sexuales infectados con VIH resistente. Debido al alto índice de resistencia primaria encontrado en la población de TS, es probable que este hecho haya ocurrido sin que el TS conozca su estatus de infección y mucho menos el del cliente, y que para que esto se lleve a cabo de manera constante haya requerido el uso de drogas ilegales o el alcohol. Según la información epidemiológica de la población de TS analizada en este estudio, el 64% de los TS HSH consumieron drogas ilegales entre ellas cocaína y marihuana. En concordancia con estos hallazgos, se ha reportado que la presencia de resistencia transmitida estuvo relacionada con la práctica sexual sin protección ($p = 0.006$) conjuntamente con el uso de estimulantes adictivos como la metanfetamina ($p = 0.004$) a partir de un grupo de HSH de San Francisco, EEUU (Chin-Hong *et al.*, 2005).

Es importante señalar que otra causa de la resistencia primaria es la recombinación propiamente dicha, la cual favorece la generación de virus resistentes a ARV (Morris *et al.*, 1999; Sucupira *et al.*, 2007). Debido a que las infecciones mixtas dan como resultado formas recombinantes con el paso del tiempo, la presencia de estas últimas también podrían estar involucradas con la resistencia primaria. En consecuencia, tanto las infecciones mixtas como la presencia de recombinación podrían estar directamente implicadas en generar cepas resistentes en la población de TS, y dado que se trata de grupos de alto riesgo de transmisión de VIH es posible que este tipo de cepas se estén transmitiendo en la población general.

6.11. Modelo de transmisión de VIH con base a las evidencias de los eventos moleculares estudiados que afectan la evolución del virus

Las evidencias moleculares encontradas y el análisis realizado de cada una de ellas, ha permitido el diseño de un modelo de transmisión de VIH para cada una de las poblaciones de TS y NTS. Según la Figura 8, las infecciones mixtas de VIH se llevarían a cabo tanto en TS como NTS, sin embargo el alto intercambio de parejas sexuales en TS facilitaría la transmisión de cepas resistentes y la recombinación, lo que daría como resultado una mayor diversidad genética en esta población. Con relación a los NTS, la resistencia a los antirretrovirales solo estaría asociada a TARGA, y dado que en esta población el número de parejas sexuales es menor

con relación a los TS, la diversidad genética también sería menor que en TS, pese a la existencia de infecciones mixtas y recombinación en la población de NTS.

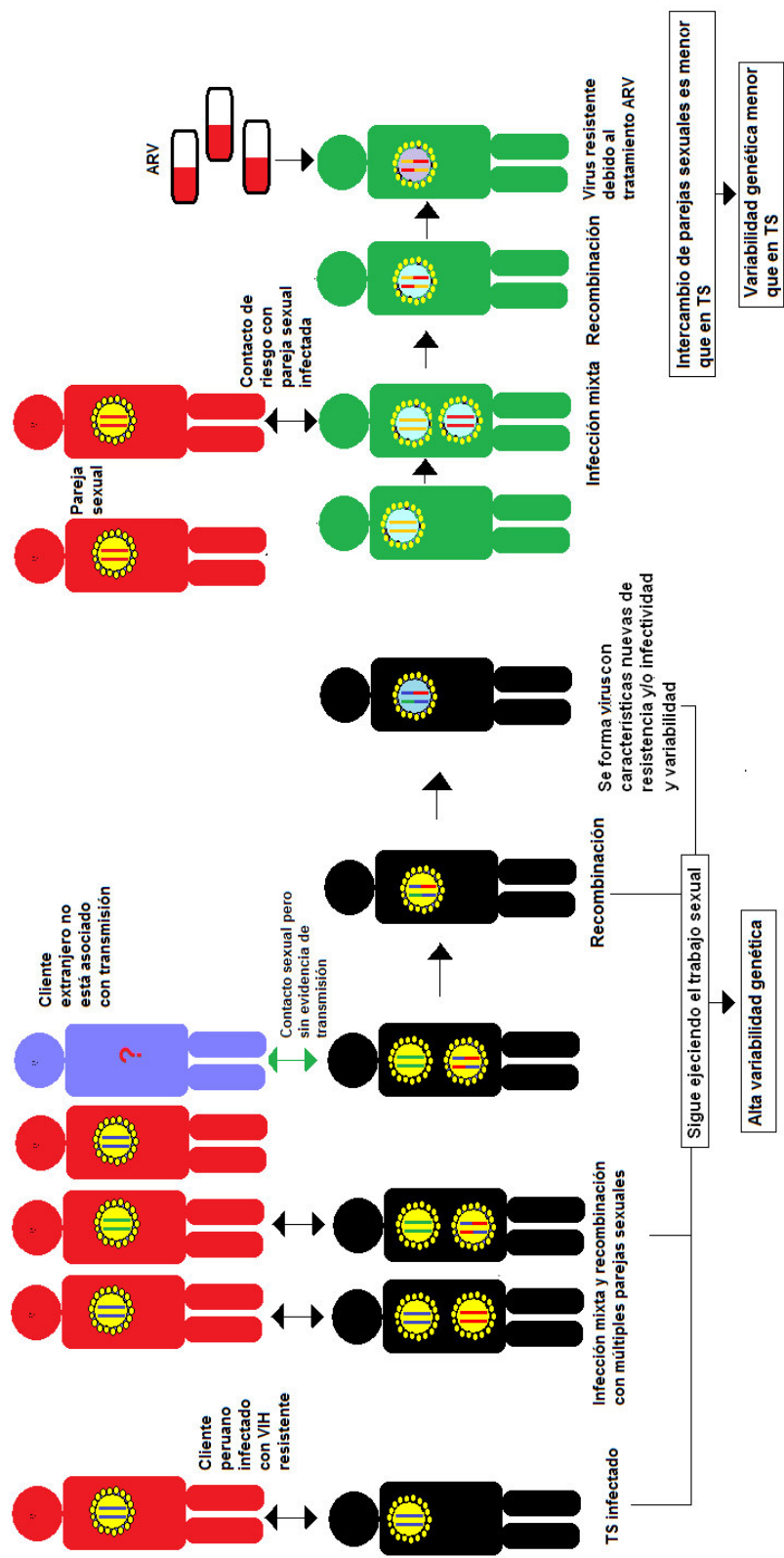


Figura 8. Modelo de transmisión del VIH en la población analizada, donde se intenta representar los eventos de evolución del VIH basados en los resultados obtenidos en el presente estudio. Nota.- ARV = antirretrovirales. TS = Trabajador(a) sexual. NTS = No trabajador (a) sexual.

7. CONCLUSIONES

- 7.1. Se demuestra que la evolución molecular del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) se manifiesta de manera diferente entre trabajadoras / trabajadores sexuales (TS) y no trabajadoras / trabajadores sexuales (NTS) de acuerdo a las características epidemiológicas y comportamiento sexual de riesgo de infección por VIH.
- 7.2. Se demuestra que el VIH que infecta la población de TS presenta una mayor diversidad genética que el grupo NTS, siendo el gen *env* el marcador genético que sufre una mayor presión de selección en comparación con los genes *gag* y *pol*. Asimismo, sigue un proceso de selección purificante de acuerdo al estadístico D de Tajima.
- 7.3. Se demuestra por análisis filogenético que el subtipo genético que circula tanto en TS como NTS es el subtipo B, habiendo tramos de recombinación genética con otros subtipos, principalmente el subtipo D.
- 7.4. Con relación a los eventos de infección mixta con variantes genéticas de VIH-1, se trata de un evento común e independiente al tipo de grupo de riesgo estudiado y que ocurre de manera continua y simultánea en el hospedero por la presencia de cepas R5 en los pacientes estudiados.
- 7.5. La población de TS presentó cepas de VIH con hipermutación y mutaciones inusuales que no se detectaron en las cepas que infectaron a los NTS.
- 7.6. Se reporta por primera vez una alta frecuencia de mutaciones deletéreas en regiones conservadas del gen *gag* implicadas en procesos de ensamblaje viral.
- 7.7. Se demuestra que el tropismo del VIH en la población estudiada fue mayoritariamente de tipo R5.

8. RECOMENDACIONES

- 8.1.** Al contar con un sistema estandarizado para la identificación del tropismo del virus, se recomienda la validación e implementación del mismo para ser usado en procedimientos de rutina para la selección de los pacientes que requieran un tratamiento de tercera línea con Maraviroc.
- 8.2.** Completar la validación del sistema de HMA-clonación-secuenciamiento para la identificación de infecciones mixtas de VIH, cuya aplicación en salud pública ayudará a priorizar la atención de pacientes con riesgo de progresar a SIDA debido es esta condición.
- 8.3.** Implementar un sistema de vigilancia de subtipos y formas recombinantes, especialmente en grupos con comportamiento de riesgo de infección por VIH/SIDA como los TS, con el fin de fortalecer los programas de diagnóstico y monitoreo de la resistencia a los ARV en este tipo de población.
- 8.4.** Empezar nuevos estudios de evolución molecular de VIH enfocado hacia un diseño de cohortes prospectivo, con el fin de describir los eventos moleculares que van ocurriendo a través del tiempo de acuerdo a las características epidemiológicas de los sujetos infectados. Ello podría ayudar a determinar con mayor precisión el momento en que los virus empiezan a sufrir cambios relacionados con su diversidad genética, tropismo, recombinación, infecciones mixtas y resistencia molecular frente a la acción de los antirretrovirales (incluso a nivel de bloqueadores de entrada) y que servirá para contar con evidencias de los factores que promueven la evolución molecular del VIH en el Perú.
- 8.5.** Realizar mayores estudios incrementando los grupos de riesgo (personas privadas de la libertad, bisexuales, clientes de trabajadores sexuales, etc.) haciendo un seguimiento del curso evolutivo del virus y entendiendo los mecanismos de transmisión del VIH a nivel nacional. Todos estos puntos podrían ayudar a establecer nuevas políticas de vigilancia centinela del VIH/SIDA asumido por el Ministerio de Salud que permita detener la expansión y generación de nuevas variantes genéticas de VIH en nuestro país.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Allen TM, Altfeld M. (2003) HIV-1 superinfection. *J Allergy Clin Immunol.* 112(5):829-35.
2. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*; 215(3):403-10.
3. An P, Winkler CA. (2010) Host genes associated with HIV/AIDS: advances in gene discovery. *Trends Genet*; 26(3):119-31.
4. Avila MM, Pando MA, Carrion G, Peralta LM, Salomon H, Carrillo MG, *et al.* (2002). Two HIV-1 epidemics in Argentina: different genetic subtypes associated with different risk groups. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 29(4):422-6.
5. Ballester-Arnal R, Salmerón-Sánchez P, Gil-Llario MD, Castro-Calvo J. (2016). Male Sex Workers in Spain: What has Changed in the Last Lustrum? A Comparison of Sociodemographic Data and HIV Sexual Risk Behaviors (2010-2015). *AIDS Behav.* Jul 22 (En impresión)
6. Baral SD, Friedman MR, Geibel S, Rebe K, Bozhinov B, Diouf D *et al.* (2015) Male sex workers: practices, contexts, and vulnerabilities for HIV acquisition and transmission. *Lancet.* 385(9964):260-73.
7. Bebenek K, Abbotts J, Roberts JD, Wilson SH, Kunkel TA. (1989) Specificity and mechanism of error-prone replication by human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase. *J Biol Chem.* 264(28):16948-56.
8. Berger EA, Murphy PM, Farber JM. (1999) Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol.*;17:657-700.
9. Berkowitz R, Fisher J, Goff SP. RNA packaging. (1996) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 214, 177–218.
10. Birnboim HC, Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7(6):1513-23.
11. Blackard JT, Cohen DE, Mayer KH. (2002) Human immunodeficiency virus superinfection and recombination: current state of knowledge and potential clinical consequences. *Clin Infect Dis.* 34(8):1108-14.
12. Bleul CC, Wu L, Hoxie JA, Springer TA, Mackay CR. (1997) The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(5):1925-30.

13. Boden D, Hurley A, Zhang L, Cao Y, Guo Y, Jones E *et al.* (1999) HIV-1 drug resistance in newly infected individuals. *JAMA*. 282(12):1135-41.
14. Cabello R. La situación del VIH / SIDA en el Perú al año 2005. VIA LIBRE. 2005.
15. Cane PA. Stability of transmitted drug-resistant HIV-1 species. (2005) *Curr Opin Infect Dis*. 18(6):537-42.
16. Castro-Nallar E, Pérez-Losada M, Burton GF, Crandall KA. (2012). The evolution of HIV: inferences using phylogenetics. *Mol Phylogenet Evol*. 62(2):777-92).
17. CDC. (1982) Current Trends Update on Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) --United States. *MMWR*. 31(37):507-508.
18. Cen S, Huang Y, Khorchid A, Darlix JL, Wainberg MA, Kleiman L. (1999) The role of Pr55(gag) in the annealing of tRNA³Lys to human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA. *J Virol*. 73(5):4485-8.
19. Cham F, Heyndrickx L, Janssens W, Vereecken K, De Houwer K, Coppens S, *et al.* (2000a). Development of a one-tube multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for the simultaneous amplification of HIV type 1 group M *gag* and *env* heteroduplex mobility assay fragments. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 16(15):1503-5.
20. Cham F, Heyndrickx L, Janssens W, Van der Auwera G, Vereecken K, De Houwer K *et al.* (2000b). Study of HIV type 1 *gag/env* variability in The Gambia, using a multiplex DNA polymerase chain reaction. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 16(17):1915-9.
21. Chen Z, Li Y, Schock HB, Hall D, Chen E, Kuo LC. (1995). Three-dimensional structure of a mutant HIV-1 protease displaying cross-resistance to all protease inhibitors in clinical trials. *J Biol Chem*. 270(37):21433-6.
22. Chin-Hong PV, Deeks SG, Liegler T, Hagos E, Krone MR, Grant RM, Martin JN. (2005). High-risk sexual behavior in adults with genotypically proven antiretroviral-resistant HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 40(4):463-71.
23. Clark JL, Konda KA, Segura ER, Salvatierra HJ, Leon SR, Hall ER *et al.* (2008). Risk factors for the spread of HIV and other sexually transmitted infections among men who have sex with men infected with HIV in Lima, Peru. *Sex Transm Infect*. 84(6):449-54.

24. Clutter DS, Jordan MR, Bertagnolio S, Shafer RW. (2016). HIV-1 drug resistance and resistance testing. *Infect Genet Evol.* 46:292-307.
25. Couto-Fernandez JC, Eyer-Silva WA, Guimarães ML, Chequer-Fernandez SL, Grinsztejn B, Delaporte E *et al.* (2006). Phylogenetic analysis of Brazilian HIV type 1 subtype D strains: tracing the origin of this subtype in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 22(2):207-11.
26. Cuevas JM, Geller R, Garijo R, López-Aldeguer J, Sanjuán R. (2015). Extremely High Mutation Rate of HIV-1 In Vivo. *PLoS Biol.* 13(9):e1002251. doi:10.1371
27. Dantas MC, Lima JN, Vitoria MA, Teixeira PR, Costa-Filho RB, Grangeiro AL. (2002). Building up a national network for HIV genotyping test in Brazil. *Int Conf AIDS.* 14:(abstract no. B10188).
28. Dawson L, Yu XF. (1998). The role of nucleocapsid of HIV-1 in virus assembly. *Virology.* 251(1):141-57.
29. De Sa Filho DJ, Sucupira MC, Casiero MM, Sabino EC, Diaz RS, Janini LM. (2006). Identification of two HIV type 1 circulating recombinant forms in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 22(1):1-13.
30. Delwart EL, Herring B, Rodrigo AG, Mullins JL. (1995). Genetic Subtyping of Human Immunodeficiency Virus Using a Heteroduplex Mobility Assay. *PCR Methods Appl.* 4(5):S202–S216.
31. Diaz RS, Sabino EC, Mayer A, Mosley JW, Busch MP. (1995). Dual human immunodeficiency virus type 1 infection and recombination in a dually exposed transfusion recipient. The Transfusion Safety Study Group. *J Virol.* 69(6):3273-81.
32. Dorfman T, Bukovsky A, Öhagen A, Höglund S, Göttinger HG. (1994). Functional domains of the capsid protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 68, 8180–8187.
33. Edwards S, Stucki H, Bader J, Vidal V, Kaiser R, Battegay M *et al.* (2015). A diagnostic HIV-1 tropism system based on sequence relatedness. *J Clin Microbiol.* 53(2):597-610.
34. Emiliani S, Blanc M, Devaux C. (1994). p17 gag sequence of HIV-1 GER, a new, highly replicative and highly cytopathic HIV type 1 strain of D genotype. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 10:1043-5.

35. Eyzaguirre LM, Charurat M, Redfield RR, Blattner WA, Carr JK, Sajadi MM. (2013). Elevated hypermutation levels in HIV-1 natural viral suppressors. *Virology*. 443(2):306-12.
36. Fang G, Weiser B, Kuiken C, Philpott SM, Rowland-Jones S, Plummer F *et al.* (2004). Recombination following superinfection by HIV-1. *AIDS*. 18(2):153-9.
37. Faria NR, Rambaut A, Suchard MA, Baele G, Bedford T, Ward MJ *et al.* (2014). HIV epidemiology. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. *Science*. 346(6205):56-61.
38. Feng YX., Campbell S., Harvin D, Ehresmann B, Ehresmann C, Rein A. (1999). The human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein has nucleic acid chaperone activity: possible role in dimerization of genomic RNA and placement of tRNA on the primer binding site. *J. Virol.* 73, 4251–4256.
39. Fernandez-Medina D, Jansson M, Rabinovich RD, Libonatti O, Wigzell H. (1999). Identification of human immunodeficiency virus type 1 subtypes B and F B/F recombinant and dual infection with these subtypes in Argentina. *Scand J Infect Dis*. 31(3):235-42.
40. Fitch WM. (1971). On the problem of discovering the most parsimonious tree. *Am. Nat.* 111:223-257.
41. Flores I, Pieniazek D, Moran N, Soler A, Rodriguez N, Alegria M, *et al.* (1999). HIV-1 subtype F in single and dual infections in Puerto Rico: A potential sentinel site for monitoring novel genetic HIV variants in North America. *Emerg Infect Dis*. 5(3):481-3.
42. Fouchier RAM, Groenink M, Kootstra NA, Tersmette M, Huisman HG, Miedema F, *et al.* (1992). Phenotype- associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule. *J Virol* 66:3183-7.
43. Fu YX. Statistical properties of segregating sites. (1995). *Theor Popul Biol*. 48(2):172-97.
44. Garcia-Lerma G, Gutierrez M, Mas A, Bravo R, Aguilera O, Soriano V. (1996). Report of the first 2 cases of HIV-1 group O infection in Spain. *Med Clin (Barc)*. 107(11):418-21.
45. Gottlieb GS, Nickle DC, Jensen MA, Wong KG, Grobler J, Li F *et al.* (2004). Dual HIV-1 infection associated with rapid disease progression. *Lancet* 363(9409):619-22.

46. Gorelick RJ, Gagliardi TD, Bosche WJ, Wiltout TA, Coren LV, Chabot DJ *et al.* (1999). Strict conservation of the retroviral nucleocapsid protein zinc finger is strongly influenced by its role in viral infection processes: characterization of HIV-1 particles containing mutant nucleocapsid zinc-coordinating sequences. *Virology*. 256(1):92-104.
47. Goulder PJ, Walker BD. (2002). HIV-1 superinfection - a word of caution. *N Engl J Med*. 347(10):756-8.
48. Grobler J, Gray CM, Rademeyer C, Seoighe C, Ramjee G, Karim SA *et al.* (2004). Incidence of HIV-1 dual infection and its association with increased viral load set point in a cohort of HIV-1 subtype C-infected female sex workers. *J Infect Dis*. 190(7):1355-9.
49. Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
50. Harris RS, Dudley JP. (2015). APOBECs and virus restriction. *Virology*. 479-480:131-45.
51. Heyndrickx L, Janssens W, Zekeng L, Musonda R, Anagonou S, Van der Auwera G, *et al.* (2000). Simplified strategy for detection of recombinant human immunodeficiency virus type 1 group M isolates by gag/env heteroduplex mobility assay. Study Group on Heterogeneity of HIV Epidemics in African Cities. *J Virol*. 74(1):363-70.
52. Hicks C. (2005). Impact of HIV protease inhibitor resistance in treatment-naive populations in the United States. *AIDS Read*. 15(12):683-6, 689-90.
53. Hillis DM, Bull JJ. (1993). An empiric test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetics analysis. *Syst. Biol.* 42(2):182-192.
54. Hirsch MS, Conway B, D'Aquila TR, Johnson VA, Brun-Vézinet F, Clotet B, *et al.* (1998). Antiretroviral Drug Resistance Testing in Adults With HIV Infection. Implications for Clinical Management. *JAMA*. 279: 1984-1991.
55. Hierholzer J, Montano S, Hoelscher M, Negrete M, Hierholzer M, Avila MM, *et al.* (2002). Molecular epidemiology of HIV type 1 in Ecuador, Peru, Bolivia, Uruguay and Argentina. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 18(18): 1339-1350.
56. HIV genotyping manual. Antiviral Resistance Test ABI 3100 genetic analyzer. Adapted from Stanford Hospital and Clinics Laboratories. pp36. USA, 2008.
57. Holmes EC, Zhang LQ, Simmonds P, Ludlam CA, Brown AJ. (1992). Convergent and divergent sequence evolution in the surface envelope glycoprotein of human

- immunodeficiency virus type 1 within a single infected patient. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(11):4835-9.
58. Huang CC, Tang M, Zhang MY, Majeed S, Montabana E, Stanfield RL *et al.* (2005). Structure of a V3-containing HIV-1 gp120 core. *Science.* 310 (5750):1025-8.
 59. Iordanskiy S, Waltke M, Feng Y, Wood C. (2010). Subtype-associated differences in HIV-1 reverse transcription affect the viral replication. *Retrovirology.* 7:85.
 60. Ish-Horowicz D, Burke JF. (1981) Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* 9(13):2989-98.
 61. Jia L, Li L, Gui T, Liu S, Li H, Han J *et al.* (2016). Analysis of HIV-1 intersubtype recombination breakpoints suggests region with high pairing probability may be a more fundamental factor than sequence similarity affecting HIV-1 recombination. *Viral J.* 13(1):156.
 62. Jost S, Bernard MC, Kaiser L, Yerly S, Hirschel B, Samri. A *et al.* (2002). A patient with HIV-1 superinfection. *N Engl J Med.* 347(10):731-6.
 63. Jukes TH & Cantor CR. Evolution of Protein Molecules. New York: Academic Press. 1969. pp. 21–132.
 64. Junqueira DM, de Medeiros RM, Gräf T, Almeida SE. (2016). Short-Term Dynamic and Local Epidemiological Trends in the South American HIV-1B Epidemic. *PLoS One* 11(6):e0156712. doi: 10.1371/journal.pone.0156712.
 65. Kaleebu P, Bobkov A, Cheingsong-Popov R, Bieniasz P, Garaev M, Weber J. (1995). Identification of HIV-1 subtype G from Uganda. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 11(5):657-9.
 66. Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* 16:111-120.
 67. Kirkwood BR & Sterne JAC. Comparing two proportions, Chi-squared tests for 2x2 and larger contingency tables. In: Essential Medical Statistics. Pages 148-165. MPG Books Ltd, Bodmin, Cornwall 2003 Ed. 2nd.
 68. Koelsch KK, Smith DM, Little SJ, Ignacio CC, Macaranas TR, Brown AJ V (2003). Clade B HIV-1 superinfection with wild-type virus after primary infection with drug-resistant clade B virus. *AIDS.* 17(7):F11-6.

69. Konings FA, Burda ST, Urbanski MM, Zhong P, Nadas A, Nyambi PN. (2006). Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) circulating recombinant form 02_AG (CRF02_AG) has a higher in vitro replicative capacity than its parental subtypes A and G. *J Med Virol* 78(5):523-34.
70. Kosakovsky Pond SL, Posada D, Stawiski E, Chappey C, Poon AF *et al.* (2009). An evolutionary model-based algorithm for accurate phylogenetic breakpoint mapping and subtype prediction in HIV-1. *PLoS Comput Biol*. 5(11): e1000581.
71. Kostrikis LG, Bagdades E, Cao Y, Zhang L, Dimitriou D, Ho DD. (1995). Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 strains from patients in Cyprus: identification of a new subtype designated subtype I. *J Virol*. 69(10):6122-30.
72. Kuiken C., Thakallapalli R., Eskild A., de Ronde A. (2000). Genetic analysis reveals epidemiologic pattern in the spread of human immunodeficiency virus. *Am J of Epidemiol*. 152(9): 814-822.
73. Kumar S, Tamura K, Nei M. (1994). MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers. *Comput Appl Biosci*. 10(2):189-91.
74. Laguna-Torres A, Olson J, Sánchez JL, Montano S, Chauca G, Carrión G *et al.* (2005). Distribución de los subtipos del VIH-1 en nueve países de América del Sur, 1995-2002. *Rev. Perú. Med. Exp. Salud Publica*. 22(1):12-17.
75. Lama JR, Sanchez J, Suarez L, Caballero P, Laguna A, Sanchez JL *et al.* (2006). Linking HIV and antiretroviral drug resistance surveillance in Peru: a model for a third-generation HIV sentinel surveillance. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 42(4):501-5.
76. Lau KA, Wong JJ. (2013). Current Trends of HIV Recombination Worldwide. *Infect Dis Rep*. 5(Suppl 1):e4. doi: 10.4081/idr.2013.s1.e4.
77. Lecossier D, Bouchonnet F, Clavel F, Hance AJ. (2003). Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein. *Science*. 300(5622):1112.
78. Mammano F, Ohagen A, Hoglund S, Gottlinger HG. (1994). Role of the major homology region of human immunodeficiency virus type 1 in virion morphogenesis. *J Virol*. 68(8):4927-36.
79. Manigart O, Courgnaud V, Sanou O, Valea D, Nagot N, Meda N *et al.* (2004). HIV-1 superinfections in a cohort of commercial sex workers in Burkina Faso as assessed by an autologous heteroduplex mobility procedure. *AIDS*. 18(12):1645-51.

80. Marin M, Rose KM, Kozak SL, Kabat D. (2003). HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat med.* 9(11):1398–403.
81. Martin DP, Williamson C, Posada D. (2005). RDP2: recombination detection and analysis from sequence alignments. *Bioinformatics.* 21(2):260-2.
82. Marx JL. (1984) Strong new candidate for AIDS agent. *Science.* 4;224(4648):475-7.
83. McCarthy MC, Wignall FS, Sanchez J, Gotuzzo E, Alarcon J, Phillips I *et al.* (1996) The epidemiology of HIV-1 infection in Peru, 1986-1990. *AIDS.* 10(10):1141-5.
84. Melo FL, Jamal LF, Zanotto PM. (2012). Characterization of primary isolates of HIV type 1 CRF28_BF, CRF29_BF, and unique BF recombinants circulating in São Paulo, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 28(9):1082-8.
85. MINSA: A Step Forward in the Fight Against AIDS. In. Lima: Ministerio de Salud del Peru (MINSA): The first two years of universal access to antiretroviral treatment in Peru; 2006.
86. Montano SM, Sanchez JL, Laguna-Torres A, Cuchi P, Avila MM, Weissenbacher M, *et al.* (2005). Prevalences, genotypes, and risk factors for HIV transmission in South America. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 40(1):57-64.
87. Morris A, Marsden M, Halcrow K, Hughes ES, Brettle RP, Bell JE, Simmonds P. (1999). Mosaic structure of the human immunodeficiency virus type 1 genome infecting lymphoid cells and the brain: evidence for frequent in vivo recombination events in the evolution of regional populations. *J Virol.* 73(10):8720-31.
88. Motomura K, Kusagawa S, Kato K, Nohtomi K, Lwin HH, Tun KM *et al.* (2000). Emergence of new forms of human immunodeficiency virus type 1 intersubtype recombinants in central Myanmar. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 16(17):1831-43.
89. Mulder LC, Harari A, Simon V. (2008). Cytidine deamination induced HIV-1 drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(14):5501-6.
90. Myers JE, Taylor BS, Rojas Fermín RA, Reyes EV, Vaughan C, José L *et al.* (2012). Transmitted drug resistance among antiretroviral-naïve patients with established HIV type 1 infection in Santo Domingo, Dominican Republic and

- review of the Latin American and Caribbean literature. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 28(7):667-74.
91. Naganawa S, Sato S, Nossik D, Takahashi K, Hara T, Tochikubo O *et al.* (2002). First report of CRF03_AB recombinant HIV type 1 in injecting drug users in Ukraine. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 18(15):1145-9.
 92. Nei M, Gojobori T. (1986). Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol*. 3(5):418-26.
 93. Neogi U, Shet A, Sahoo PN, Bontell I, Ekstrand ML, Banerjee AC *et al.* (2013). Human APOBEC3G-mediated hypermutation is associated with antiretroviral therapy failure in HIV-1 subtype C-infected individuals. *J Int AIDS Soc*. 16:18472.
 94. Nopkesorn T, Mock PA, Mastro TD, Sangkharomya S, Sweat M, Limpakarnjanarat K *et al.* (1998). HIV-1 subtype E incidence and sexually transmitted diseases in a cohort of military conscripts in northern Thailand. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 18(4):372-9.
 95. Oficina General de Epidemiología (OGE). Situación del VIH-SIDA en el Perú. Boletín Epidemiológico Mensual. Ministerio de Salud. Diciembre 2016.
 96. Onafuwa-Nuga A, Telesnitsky A. (2009). The remarkable frequency of human immunodeficiency virus type 1 genetic recombination. *Microbiol Mol Biol Rev*. 73(3):451-80.
 97. Pérez L, Thomson MM, Bleda MJ, Aragonés C, González Z, Pérez J *et al.* (2006). HIV Type 1 molecular epidemiology in Cuba: high genetic diversity, frequent mosaicism, and recent expansion of BG intersubtype recombinant forms. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 22(8):724-33.
 98. Piantadosi A, Chohan B, Chohan V, McClelland RS, Overbaugh J. (2007). Chronic HIV-1 infection frequently fails to protect against superinfection. *PLoS Pathog*. 3(11):e177.
 99. Piantadosi A, Chohan B, Panteleeff D, Baeten JM, Mandaliya K, Ndinya-Achola JO *et al.* (2009). HIV-1 evolution in gag and env is highly correlated but exhibits different relationships with viral load and the immune response. *AIDS*. 23(5):579-87.
 100. Philpott SM. (2003). HIV-1 coreceptor usage, transmission, and disease progression. *Curr HIV Res*. 1(2):217-27.

101. Pineda-Peña AC, Bello DC, Sussmann O, Vandamme AM, Vercauteren J, van Laethem K *et al.* (2012). HIV-1 transmitted drug resistance in Latin America and the Caribbean: what do we know? *AIDS Rev.* 14(4):256-67.
102. Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemée V *et al.* (2009). A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med.* 15(8):871-2.
103. Posada D, Crandall KA. (1998). MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics.* 14(9):817-8.
104. Posada D, Crandall KA, Hillis D. Phylogenetics of HIV. In: Computational and Evolutionary Analysis of HIV Molecular Sequences. Edited by Rodrigo AG & Learn GH. Kluwer Academic Publishers. Pages pp 121-160. The Newtherland 2001.
105. Rambaut A, Posada D, Crandall KA, Holmes EC. (2004). The causes and consequences of HIV evolution. *Nat Rev Genet.* 5(1):52-61.
106. Ramos A, Tanuri A, Schechter M, Rayfield MA, Hu DJ, Cabral MC, *et al.* (1999). Dual and recombinant infections: an integral part of the HIV-1 epidemic in Brazil. *Emerg Infect Dis.* 5(1):65-74.
107. Ramos A, Hu DJ, Nguyen L, Phan KO, Vanichseni S, Promadej N *et al.* (2002). Intersubtype human immunodeficiency virus type 1 superinfection following seroconversion to primary infection in two injection drug users. *J Virol.* 76(15):7444-52.
108. Rath BA, von Kleist M, Castillo ME, Kolevic L, Caballero P, Soto-Castellares G *et al.* (2013). Antiviral resistance and correlates of virologic failure in the first cohort of HIV-infected children gaining access to structured antiretroviral therapy in Lima, Peru: a cross-sectional analysis. *BMC Infect Dis.* 13:1. doi: 10.1186/1471-2334-13-1.
109. Reicin AS, Paik S, Berkowitz RD, Luban J, Lowy I, Goff SP. (1995). Linker insertion mutations in the human immunodeficiency virus type 1 gag gene: effects on virion particle assembly, release, and infectivity. *J Virol.* 69(2):642-50.
110. Requejo HI. (2006). Worldwide molecular epidemiology of HIV. *Rev Saude Publica.* 40(2):331-45. 2006.
111. Rhee SY, Fessel WJ, Zolopa AR, Hurley L, Liu T, Taylor J. *et al.* (2005). HIV-1 Protease and reverse-transcriptase mutations: correlations with antiretroviral

- therapy in subtype B isolates and implications for drug-resistance surveillance. *J Infect Dis.* 192(3):456-65. 2005.
112. Rhee SY, Sankaran K, Varghese V, Winters MA, Hurt CB, Eron JJ, *et al.* (2016). HIV-1 Protease, Reverse Transcriptase, and Integrase Variation. *J Virol.* 90(13):6058-70.
 113. Ríos M, Delgado E, Pérez-Alvarez L, Fernández J, Gálvez P, de Parga EV *et al.* (2007). Antiretroviral drug resistance and phylogenetic diversity of HIV-1 in Chile. *J Med Virol.* 79(6):647-56.
 114. Robles J, Doers M. pGEM®-T Vector Systems troubleshooting guide. Promega Notes Magazine. 1994; 45, 19.
 115. Ruchansky D, Casado C, Russi JC, Arbiza JR, Lopez-Galindez C. (2009). Identification of a new HIV Type 1 circulating recombinant form (CRF38_BF1) in Uruguay. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 25(3):351-6.
 116. Russell KL, Carcamo C, Watts DM, Sanchez J, Gotuzzo E, Euler A (2000). *et al.* Emerging genetic diversity of HIV-1 in South America. *AIDS.* 14(12):1785-91.
 117. Russell RA, Moore MD, Hu WS, Pathak VK. (2009). APOBEC3G induces a hypermutation gradient: purifying selection at multiple steps during HIV-1 replication results in levels of G-to-A mutations that are high in DNA, intermediate in cellular viral RNA, and low in virion RNA. *Retrovirology.* 6:16.
 118. Saitou N, Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4(4):406-25.
 119. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA. 1989 Ed. 2nd.
 120. Sambrook J, Russell DW. Isolation of DNA fragments from polyacrylamide gels by the crush and soak method. CSH Protoc. 2006 (1). pii: pdb.prot2936. doi: 10.1101/pdb.prot2936.
 121. Shafer RW. (2002). Genotyping testing for Human Immunodeficiency Virus Type 1 drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 15(2): 247-77.
 122. Shuman, S. (1991). Recombination Mediated by Vaccinia Virus DNA Topoisomerase I in Escherichia coli is Sequence Specific. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 10104-10108.

123. Shuman, S. (1994). Novel Approach to Molecular Cloning and Polynucleotide Synthesis Using Vaccinia DNA Topoisomerase. *J. Biol. Chem.* 269, 32678-32684.
124. Siddappa NB, Dash PK, Mahadevan A, Desai A, Jayasuryan N, Ravi V, *et al.* (2005). Identification of unique B/C recombinant strains of HIV-1 in the southern state of Karnataka, India. *AIDS*. 19(13):1426-9.
125. Smith DM, Richman DD, Little SJ. (2005). HIV superinfection. *J Infect Dis.* 192(3):438-44.
126. Soria J, Bull M, Mitchell C, La Rosa A, Dross S, Kraft K *et al.* (2012). Transmitted HIV resistance to first-line antiretroviral therapy in Lima, Peru. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 28(4):333-8.
127. Sucupira MC, Caseiro MM, Alves K, Tescarollo G, Janini LM, Sabino EC *et al.* (2007). High levels of primary antiretroviral resistance genotypic mutations and B/F recombinants in Santos, Brazil. *AIDS Patient Care STDS*. 21(2):116-28.
128. Tajima F. (1989). Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 123:585-595.
129. Tebit DM, Nankya I, Arts EJ, Gao Y. (2007). HIV diversity, recombination and disease progression: how does fitness "fit" into the puzzle?. *AIDS Rev.* 9(2):75-87. Review.
130. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22(22):4673-80.
131. Thomson MM, Najera R. (2005). Molecular epidemiology of HIV-1 variants in the global AIDS pandemic: an update. *AIDS Rev.* 7(4):210-24.
132. Thorne JL, Kishino H, Felsenstein J. (1991). An evolutionary model for maximum likelihood alignment of DNA sequences. *J Mol Evol.* 33(2):114-24.
133. Tozzi V, Corpolongo A, Bellagamba R, Narciso P. (2005). Managing patients with sexual transmission of drug-resistant HIV. *Sex Health.* 2(3):135-42.
134. United Nations Programme on HIV/ Acquired Immune Deficiency Syndrome (UNAIDS). AIDS by the numbers 2016a. En: http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/AIDS-by-the-numbers-2016_en.pdf. Última visita: 24 de enero de 2017.

135. United Nations Programme on HIV/ Acquired Immune Deficiency Syndrome (UNAIDS). Global AIDS Update 2016b. En: http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/global-AIDS-update-2016_en.pdf. Última visita: 20 de enero de 2017.
136. United Nations Programme on HIV/ Acquired Immune Deficiency Syndrome (UNAIDS). Together we will end AIDS. En: http://files.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2012/JC2296_UNAIDS_TogetherReport_2012_en.pdf Última visita: 24 de enero de 2017
137. Urbaneja MA, Kane BP, Johnson DG, Gorelick RJ, Henderson LE, Casas-Finet JR. (1999). Binding properties of the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein p7 to a model RNA: elucidation of the structural determinants for function. *J Mol Biol.* 287(1):59-75.
138. Van der Auwera, G Heyndrickx L. HIV-1 group M gag Heteroduplex Mobility Analysis (HMA) Subtyping Kit. Protocol version 3, December 2000.
139. Van der Kuyl AC, Cornelissen M. (2007). Identifying HIV-1 dual infections. *Retrovirology.* 4:67.
140. Verhofstede C, Nijhuis M, Vandekerckhove L. (2012). Correlation of coreceptor usage and disease progression. *Curr Opin HIV AIDS.* 7(5):432-9.
141. Viñoles J, Serra M, Russi JC, Ruchansky D, Sosa-Estani S, Montano SM, *et al.* (2005). Seroincidence and phylogeny of human immunodeficiency virus infections in a cohort of commercial sex workers in Montevideo, Uruguay. *Am J Trop Med Hyg.* 72(4):495-500.
142. Vrancken B, Lemey P, Rambaut A, Bedford T, Longdon B, Günthard HF *et al.* (2015). Simultaneously estimating evolutionary history and repeated traits phylogenetic signal: applications to viral and host phenotypic evolution. *Methods Ecol Evol.* 6(1):67-82.
143. Weber J, Piontkivska H, Quiñones-Mateu ME. (2006). HIV type 1 tropism and inhibitors of viral entry: clinical implications. *AIDS Rev.* 8(2):60-77.
144. Wyatt R & Sodroski J. (1998). The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science*; 280: 1884–1888.
145. Wilson JW, Bean P, Robins T, Graziano F, Persing DH. (2000). Comparative evaluation of three human immunodeficiency virus genotyping systems: the HIV-GenotypR Method, the HIV *prt* GeneChip assay, and the HIV-1 RT line probe assay. *J Clin Microbiol.* 38(8):3022-8.

146. Wolfe ND, Switzer WM, Carr JK, Bhullar VB, Shanmugam V, Tamoufe U, *et al.* (2004). Naturally acquired simian retrovirus infections in central African hunters. *Lancet*. 363(9413):932-7.
147. World Health Organization. AIDS epidemic update: May 2016a. En: http://www.who.int/hiv/data/epi_core_2016.png?ua=1 (Última visita, 20 de enero de 2017).
148. World Health Organization. HIV Drug Resistance. Global report on early warning indicators of HIV drug resistance. July 2016b. En: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/246219/1/9789241511179-eng.pdf?ua=1> (Última visita 23 de enero de 2016).
149. World Medical Association. (2013). World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*. 310(20):2191-4. doi: 10.1001/jama.2013.281053.
150. Xia X, Xie Z. (2001). DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. *J Hered*. 92(4):371-3.
151. Yabar C. (2003). Eventos moleculares, genéticos e inmunológicos durante la interacción VIH-hombre. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*; 20(2): 107-115
152. Yabar C, Acuña M, Gazzo C, Salinas G, Cárdenas F, Valverde A *et al* (2012). New Subtypes and Genetic Recombination in HIV Type 1-Infecting Patients with Highly Active Antiretroviral Therapy in Peru (2008-2010). *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012; 28(12):1712-22.
153. Yabar C., Salvatierra J, Quijano E. Características epidemiológicas del comportamiento sexual en hombres y mujeres trabajadores sexuales infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 de Lima y Callao. IX Congreso Peruano de Enfermedades Infecciosas y Tropicales - II Congreso Peruano de Control de Infecciones Intrahospitalarias - I Congreso Peruano de SIDA "Dr Manuel Huaroto Sedda". [Abstract 84] Lima, Setiembre de 2005.
154. Yabar C, Salvatierra J, Quijano E. (2008). Polymorphism, recombination and mutations in HIV-1 gag infecting Peruvian male sex workers. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2008; 24(11): 1405-13.
155. Yabar C, Salvatierra J, Quijano E. (2007). Variabilidad del gen de la envoltura del VIH-1 en tres grupos humanos con diferentes conductas sexuales de riesgo para adquirir ITS-VIH. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 24(3):202-210.

- 156.** Yabar C., Varas Z, Rodríguez R. (2006). Identificación molecular de mutaciones puntuales relacionadas con resistencia a drogas en VIH.-1 de pacientes peruanos. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 23(3):149-157.
- 157.** Yang O, Daar ES, Jamieson BD, Balamurugan A, Smith DM, Pitt JA *et al.* (2005). Human immunodeficiency virus type 1 clade B superinfection: evidence for differential immune containment of distinct clade B strains. *J Virol.* 79(2):860-8.
- 158.** Zhang M, Foley B, Schultz AK, Macke JP, Bulla I, Stanke M, Morgenstern B, Korber B, Leitner T. (2010). The role of recombination in the emergence of a complex and dynamic HIV epidemic. *Retrovirology.* 7:25.
- 159.** Zhu T, Wang N, Carr A, Wolinsky S, Ho DD. (1995). Evidence for coinfection by multiple strains of human immunodeficiency virus type 1 subtype B in an acute seroconverter. *J Virol.* 69(2):1324-7.
- 160.** Zhuang J, Jetzt AE, Sun G, Yu H, Klarmann G, Ron Y *et al.* (2002). Human immunodeficiency virus type 1 recombination: rate, fidelity, and putative hot spots. *J Virol.* 76(22):11273-82.

10. ANEXOS

10.1. Deleciones e inserciones observadas en el gen *env* de VIH-1 en la población analizada

	138	197
HXB2-89	GTGGTGTCAACTCAACTGCTGTTCAATGGCAGTCTAGCAGAAGGAG---AGGTAGTAATC	
BM98	GTAGTGTCAACTCAACTGCTGTTAAATGGCAGTCTGGCAGAAAAAG---AGGTAGTAATT	
BM102	GTAGTGTCAACTCAACTGCTGTTGAATGGCAGCCTAGCAGAAGG---GGTAGTGATT	
A11	GTAGTGTCAACTCAATTGCTGTTAAATGGCAGTCTAGCAGAAGGCG---AGGTAGTAATT	
BM92	GTAGTGTCAACTCAACTGCTGCTAAATGGCAGTCTAGCAGAAGGAG---AGGTAGTAATT	
A28	GTAGTGTCAACTCAACTGCTGTTAAATGGCAGTCTAGCAGAAGGAG---ATGTAGTACTT	
BM66a	GTAGTGTCAACTCAACTGCTGTTAAATGGCAGTCTAGCAGAAGGAA---AAGTGGTAATT	
BM11	GTAGTATCAACTCAACTGCTGTTAAATGGCAGTCTAGCAAAAGAAA---GGATAGTACCT	
A9	GTGGTGTCAACTCAACTGCTGTTCAATGGCAGTCTAGCAGAAGGAGGAGAGGTAGTAATC	
Bm52	GTAGTGTCAACTCAACTGCTGCTGAATGGCAGTCTAGCAGAAGAAG---AGGTAGTAATT	
BF4a	ACAGTGTCAACTCAATTGCTGTTAAATGGCAGTCTAGCAGAAGAAG---AGGTAGTAATT	
BF4b	ACAGTGTCAACTCAATTGCTGTTAAATGGCAGTCTAGCAGAAGAAG---AGGTAGTAATT	
A6	GTAGTGTCAACTCAACTGCTGTTAAATGGCAGTCTAGCAGAGGAAG---AGGTAGCAATC	
BF23b	GTAGTGTCAACCCCAACTGCTGTTAAATGGTAGTCTAGCAGAAGAAG---GGGTAGTAATT	

Nota: El alineamiento de secuencias se realizó con relación a la cepa de VIH-1 de referencia HXB2-89 (cepa estándar). El recuadro azul indica una deleción en la muestra código BM102 (Trabajador sexual) con relación a las demás secuencias, mientras que el recuadro rojo indica una inserción de la muestra código A9 (No trabajador sexual). Los números colocados al inicio y al final de la secuencia indican la posición del nucleótido en el gen *env*. El alineamiento se realizó mediante el programa ClustalW (Ver materiales y métodos).

10.2. GLOSARIO DE TÉRMINOS

- **Analizador genético:** Equipo automatizado que permite la lectura y registro de la secuencia de nucleótidos del ADN representado a través de un electroferograma.
- **Antirretroviral:** Droga o fármaco que permite inhibir la acción enzimática de la proteasa o la transcriptasa del VIH.
- **Cepa viral R5:** VIH que tiene la habilidad de unirse al co-receptor CCR5 de la célula hospedera de manera específica.
- **Cepa viral X4:** VIH que tiene la habilidad de unirse al co-receptor CXCR4 de la célula hospedera de manera específica.
- **Clonación molecular:** conjunto de métodos de biología molecular destinados a insertar un fragmento de ADN dentro de un vector plasmídico para ser replicados dentro de una célula procariota o eucariota.
- **Co-receptor CCR5:** Proteína transmembrana que regula la transmisión de señales célula-célula, principalmente entre linfocitos y células dendríticas. Durante el proceso de infección por VIH sirve de unión específica con la proteína viral gp120 lo que facilita la internalización del virus.
- **Co-receptor CXCR4:** Proteína transmembrana que regula procesos de señalización del sistema nervioso e inmunológico. También sirve de unión específica con la proteína viral gp120 en una etapa avanzada de la infección.
- **Electroferograma:** Gráfico que representa el resultado de una secuenciación automática de ADN generado por un equipo analizador genético a través de un programa informático.
- **Electroforesis:** Técnica utilizada para separar partículas coloidales tales como proteínas o ácidos nucleicos a través una matriz sólida (gel de agarosa, poliacrilamida, polímero) de acuerdo a su tamaño y carga eléctrica mediante la aplicación de un campo eléctrico (IUPAC, NHLBI, DOE).
- **Evolución molecular:** Cambios evolucionarios que ocurren a nivel del ADN como las tasas de cambios de secuencia, cambios relativos de tipo adaptativos y neutrales, y cambios en la estructura del ADN.
- **Factor de riesgo:** Cualquier atributo, característica o exposición de un individuo que incrementa la probabilidad de desarrollar una enfermedad o

daño.

- **Gen:** Unidad básica, física y funcional de un organismo, constituida de ADN o ARN, cuya información permite la síntesis de proteínas y otras funciones no codificantes.
- **Genotipificación:** Prueba molecular que identifica la presencia de mutaciones en el genoma del VIH-1, que pueden estar asociadas con la resistencia del virus a los antirretrovirales.
- **Heterodúplex de ADN:** Alineamiento de dos hebras de ADN de secuencia genética diferente.
- **Homodúplex de ADN:** Alineamiento de dos hebras de ADN secuencia genética idéntica.
- **Inhibidor de entrada:** Medicamento que se une directamente al co-receptor CCR5 de la célula hospedera para bloquear la unión del VIH-1 cepa R5, ejemplo: Maraviroc.
- **Marcador molecular:** Cualquier región (locus) de un gen que brinda información sobre la variación genética de diferentes organismos.
- **Mutación:** Cambio de un nucleótido por otro en una posición específica del ADN.
- **Mutación compensatoria:** Es la que permite mantener la funcionalidad de la proteasa o transcriptasa reversa viral cuando éstas presentan mutaciones de resistencia.
- **Mutación de resistencia a los antirretrovirales:** Es la que genera un cambio de aminoácido de tipo no conservado en la proteasa o transcriptasa reversa del VIH produciendo por sí solo resistencia a una determinada droga antirretroviral.
- **Mutación menor de resistencia a la proteasa:** Es la que promueve la resistencia a un antirretroviral inhibidor de proteasa viral en conjunto con una mutación principal, sin embargo, por sí sola no necesariamente genera resistencia.
- **Mutación no sinónima:** Cambio de nucleótido que genera cambio de aminoácido.
- **Mutación principal de resistencia a la proteasa:** Es la que genera resistencia por sí misma a un antirretroviral inhibidor de proteasa viral.

- **Mutación sinónima:** Cambio de nucleótido que no genera cambio de aminoácido.
- **Proteína de la envoltura de VIH (ENV):** Glicoproteína viral conformada por la subunidad gp120 que se proyecta hacia el exterior de la membrana del virus, y la subunidad gp41 que es transmembrana. Está conformada por cinco regiones variables (V1 al V5) y cinco regiones constantes (C1 al C5), las que en su conjunto participan en el primer proceso de infección durante el reconocimiento virus-célula.
- **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):** Técnica enzimática que permite la amplificación *in vitro* (aumento en el número de copias) de una región específica de ADN.
- **Región V3:** Región hipervariable de la proteína ENV la cual participa en el reconocimiento de los receptores CD4, CCR5 y CXCR4 de la célula hospedera para facilitar la entrada del VIH.
- **Resistencia a los antirretrovirales:** Es la característica genotípica y fenotípica de las cepas mutantes de VIH de presentar una disminución de la sensibilidad a una droga.
- **Transgénero:** personas cuyas identidades de género son diferentes al género que se les asignó al nacer.
- **Transición:** Mutación puntual que consiste en el cambio de un nucleótido por otro de la misma clase (es decir, purina por purina o pirimidina por pirimidina).
- **Transversión:** Mutación puntual que consiste en el cambio de un nucleótido por otro de distinta clase (es decir, purina por pirimidina o pirimidina por purina).
- **Trascripción Reversa, transcriptasa inversa o retrotranscriptasa:** Enzima que sintetiza ADN de doble cadena utilizando como molde ARN monocatenario.
- **Tropismo del VIH:** Es la habilidad del virus para unirse a un co-receptor específico.
- **VIH:** Iniciales del Virus de la Inmunodeficiencia Humana, agente causal del Síndrome de la Inmunodeficiencia Humana.

10.3. ANEXO 3. ARTÍCULOS PUBLICADOS DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS

1. **Yabar CA**, Acuña M, Gazzo C, Salinas G, Cardenas F, Valverde A, Romero S. New subtypes and genetic recombination in HIV-1 infecting patients with HAART in Peru (2008 - 2010). *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012; 28(12):1712-22.
2. **Yabar C**, Salvatierra J, Quijano E. Polymorphism, recombination and mutations in HIV-1 gag infecting Peruvian male sex workers. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2008; 24(11): 1405-13.
3. **Yabar C**, Salvatierra J, Quijano E. Variabilidad del gen de la envoltura del VIH-1 en tres grupos humanos con diferentes conductas sexuales de riesgo para adquirir ITS-VIH. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 2007; 24(3):202-210.
4. **Yabar C**, Varas Z, Rodríguez R. Identificación molecular de mutaciones puntuales relacionadas con resistencia a drogas en VIH.-1 de pacientes peruanos. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2006; 23(3):149-157.